

EXPRESS MAIL MAILING LABEL

No. EV 901362310 US

07-31-06

JTm

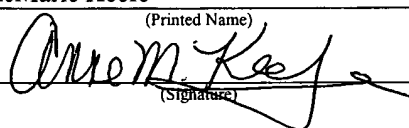
Serial No.:

Atty. Dkt. No. 075067-0501



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: HOERR INGMAR, et al.  
Title: COMBINATION THERAPY FOR IMMUNOSTIMULATION  
Appl. No.: 10/580,746 ✓  
Filing Date: 31-Aug-2005

<b>CERTIFICATE OF EXPRESS MAILING</b>	
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service's "Express Mail Post Office To Addressee" service under 37 C.F.R. § 1.10 on the date indicated below and is addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.	
EV901362310 US	July 28, 2006
(Express Mail Label Number)	(Date of Deposit)
AnneMarie Keefe	
(Printed Name)	
	
(Signature)	

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

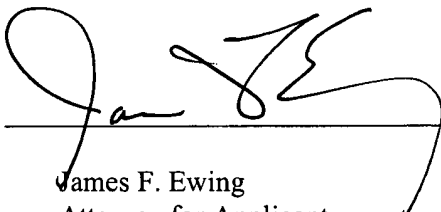
Dear Sir:

The present application was filed pursuant to 35 U.S.C. 371 of International patent application number PCT/EP2005/009383, which was filed on August 31, 2005 and claims the benefit of priority to German patent application number DE 10 2004 042 546.9, which was filed on September 2, 2004. Pursuant to 35 U.S.C. 119(b), Applicants enclose a certified copy of priority application number DE 10 2004 042 546.9.

Date July 27, 2006

FOLEY & LARDNER LLP  
111 Huntington Avenue  
Boston, Massachusetts 02199  
Telephone: (617) 342-4088  
Facsimile: (617) 342-4001

Respectfully submitted,

By   
James F. Ewing  
Attorney for Applicant  
Registration No. 52,875

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung DE 10 2004 042 546.9 über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 10 2004 042 546.9

**Anmeldetag:** 02. September 2004

**Anmelder/Inhaber:** CureVac GmbH, 72076 Tübingen/DE

**Bezeichnung:** Kombinationstherapie zur Immunstimulation

**IPC:** A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Mai 2006  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

Stark

A 9161  
03/00  
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

Anmelder:  
CureVac GmbH  
Paul-Ehrlich-Str. 15  
72076 Tübingen

5

### Kombinationstherapie zur Immunstimulation

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immunstimulation in einem Säugetier, wobei das Verfahren das Verabreichen einer mRNA, die für ein Antigen eines pathogenen Mikroorganismus kodiert, sowie das Verabreichen mindestens eines Cytokins, insbesondere GM-CSF, mindestens einer CpG DNA oder mindestens einer Adjuvanz-mRNA umfasst.

15

Mit herkömmlichen Impfstoffen, die abgeschwächte oder inaktivierte Pathogene sowie weitere Substanzen, wie Zucker oder Proteinanteile, umfassen, können im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen befriedigende Ergebnisse erreicht werden. Jedoch ist es nicht möglich, mit solchen Impfstoffen einen ausreichenden Schutz gegen eine Vielzahl infektiöser Organismen, wie zum Beispiel HIV oder *Plasmodium Falciparum*, und insbesondere gegenüber Tumoren zu erzielen. Darüber hinaus besteht das Risiko, dass durch unerwünschte Rekombinationsereignisse neue Pathogene auftreten (wie z.B. im Fall der SARS-Epidemie).

20

25

In der Therapie und Prävention zahlreicher Erkrankungen spielen daher molekularmedizinische Verfahren, wie die Gentherapie und die genetische Vakzinierung, eine große Rolle. Basis dieser Verfahren ist die Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen bzw. Gewebe des Patienten, gefolgt von der Verarbeitung der durch die eingebrachten Nukleinsäuren kodierten Informationen, d.h. der Expression der erwünschten Polypeptide bzw. Proteine. Als einzubringende Nukleinsäuren kommt hierbei sowohl DNA als auch RNA in Betracht.

30

Genetische Vakzinierungen, die aus der Injektion von nackter Plasmid-DNA bestehen, wurden erstmals in den frühen 90iger Jahren an Mäusen demonstriert. Es stellte sich jedoch in Studien der klinischen Phasen I/II heraus, dass diese Technologie beim Menschen nicht die durch die Studien an Mäusen geweckten Erwartungen erfüllen konnte (6). Zahlreiche DNA-

basierte genetische Vakzinierungen wurden seitdem entwickelt. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Verfahren zur Einbringung von DNA in Zellen, wie bspw. Calciumphosphat-Transfektion, Polypren-Transfektion, Protoplasten-Fusion, Elektroporation, Mikroinjektion und Lipofektion, entwickelt worden, wobei sich insbesondere die Lipofektion als geeignetes Verfahren herausgestellt hat. Ebenfalls kommt die Verwendung von DNA-Viren als DNA-Vehikel in Betracht. Derartige Viren erzielen aufgrund ihrer infektiösen Eigenschaften eine sehr hohe Transfektionsrate. Die verwendeten Viren werden bei diesem Verfahren genetisch verändert, damit in der transfizierten Zelle keine funktionsfähigen infektiösen Partikel gebildet werden. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahme kann jedoch, z.B. aufgrund möglicher Rekombinationsereignisse, ein Risiko der unkontrollierten Ausbreitung der eingebrachten gentherapeutisch wirksamen sowie viralen Gene nicht ausgeschlossen werden. Daneben birgt die DNA-Vakzinierung weitere potentielle Sicherheitsrisiken (7, 8). Die injizierte rekombinante DNA muss zunächst den Zellkern erreichen, dieser Schritt kann bereits die Effizienz der DNA-Vakzinierung verringern. Im Zellkern besteht die Gefahr, dass die DNA in das Wirtsgenom integriert. Die Integration von Fremd-DNA in das Wirtsgenom kann Einfluss auf die Expression der Wirtsgene haben und eventuell die Expression eines Onkogens oder die Zerstörung eines Tumorsuppressorgens auslösen. Ebenfalls kann ein für den Wirt essentielles Gen – und damit das Genprodukt – durch die Integration der Fremd-DNA in den kodierenden Bereich dieses Gens inaktiviert werden. Eine besondere Gefahr besteht dann, wenn die Integration der DNA in ein Gen erfolgt, das in die Regulation des Zellwachstums involviert ist. In diesem Fall kann die Wirtszelle in einen entarteten Zustand gelangen und zur Krebs- bzw. Tumorbildung führen.

Darüber hinaus ist es für die Expression einer in die Zelle eingebrachten DNA erforderlich, dass die entsprechenden DNA-Vehikel einen starken Promotor, wie den viralen CMV-Promotor, enthalten. Die Integration derartiger Promotoren in das Genom der behandelten Zelle kann zu unerwünschten Veränderungen der Regulierung der Genexpression in der Zelle führen. Ein weiterer Nachteil ist, dass die DNA-Moleküle für lange Zeit im Zellkern verbleiben, entweder als Episom oder, wie erwähnt, in das Wirtsgenom integriert. Dies führt zu einer zeitlich nicht begrenzten bzw. nicht begrenzbaren Produktion des transgenen Proteins und zu der Gefahr einer damit verbundenen Toleranz gegenüber diesem transgenen Protein.

Weiterhin kann durch die Injektion von DNA die Entwicklung von anti-DNA-Antikörpern (9) und die Induktion von Autoimmunkrankheiten ausgelöst werden.

Sämtliche dieser aufgezählten Risiken, die mit einer genetischen Vakzinierung verbunden sind, liegen nicht vor, wenn messenger RNA (mRNA) anstelle von DNA verwendet wird. Beispielsweise integriert mRNA nicht in das Wirtsgenom, bei der Verwendung von RNA als Vakzine sind keine viralen Sequenzen, wie Promotoren etc., zur wirksamen Transkription erforderlich usw.. Zwar ist RNA gegenüber DNA weitaus instabiler (verantwortlich für die Instabilität der RNA sind insbesondere RNA-abbauende Enzyme, sog. RNasen (Ribonucleasen), aber auch zahlreiche weitere Prozesse, welche die RNA destabilisieren), jedoch sind im Stand der Technik mittlerweile Verfahren zur Stabilisierung von RNA bekannt. So beispielsweise in WO 03/051401, WO 02/098443, WO 99/14346, EP-A-1083232, US 5,580,859 und US 6,214,804. Es sind auch Methoden zum Schutz der RNA vor einer Degradierung durch Ribonukleasen entwickelt worden, die unter der Verwendung von Liposomen (15) oder einer intra-cytosolischen *in vivo* Verabreichung der Nukleinsäure mit einer ballistischen Vorrichtung ("Gene gun") erfolgen (16). Ebenfalls wurde eine *ex vivo* Methode vorgestellt, die sich auf die Transfektion von dendritischen Zellen beziehen (12).

Für eine RNA-basierte Vakzinierung wurden u.a. Immunisierungsstrategien entwickelt, die auf selbst-replizierender RNA basieren, die sowohl für ein Antigen als auch eine virale RNA Replikase kodieren (13, 14). Solche Verfahren sind zwar effizient, jedoch bestehen Sicherheitsrisiken bei der Verwendung von viralen RNA-Replikasen in genetischen Vakzinen (eine Rekombination zwischen der injizierten RNA und der endogenen RNA könnte zu der Bildung neuer Typen von alpha-Viren führen).

Insgesamt ist festzustellen, dass im Stand der Technik keine mRNA-Vakzine beschrieben wird, welche die Auslösung einer Immunantwort in dem Organismus, dem sie appliziert wird, sicherstellt, diese erhöht und dabei unerwünschte Nebenwirkungen weitestgehend vermeidet.

Ein weiterer großer Nachteil der im Stand der Technik bekannten mRNA-Vakzine besteht darin, dass durch eine mRNA-Vakzinierung lediglich eine humorale Immunantwort (Typ Th2) ausgelöst wird. Alle Viren und zahlreiche Bakterien, wie beispielsweise Mycobakterien

und Parasiten, dringen jedoch in die Zellen ein, vermehren sich dort und sind so vor Antikörpern geschützt. Um daher insbesondere eine antitumorale oder antivirale Immunantwort hervorzurufen, ist die Auslösung einer zellulären Immunantwort (Typ Th1) erforderlich.

- 5 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, ein neues System zur Gentherapie und genetischen Vakzinierung bereitzustellen, das eine effektivere Immunantwort und damit einen effektiveren Schutz insbesondere gegenüber intrazellulären Pathogenen und den durch diese hervorgerufenen Erkrankungen gewährleistet.

- 10 Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Immunstimulation in einem Säugetier umfassend die folgenden Schritte:

- 15       a. Verabreichen mindestens einer mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und  
       b. Verabreichen mindestens eines Cytokins, mindestens einer CpG DNA oder mindestens einer Adjuvanz-mRNA..

- 20 Nachfolgend wird die mRNA, die einen für mindestens ein Antigen aus einem Pathogen oder mindestens ein Tumorantigen kodiert, als „erfindungsgemäße mRNA“ bezeichnet. Es handelt sich hierbei um die in Schritt (a.) des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte mRNA. Diese kann modifiziert oder nicht modifiziert vorliegen.

- 25 Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass die Injektion von nackter stabilisierter mRNA eine spezifische Immunantwort hervorruft (17). Erfindungsgemäß wurde eine solche antigen-spezifische Immunantwort näher untersucht, insbesondere im Vergleich zu einer DNA-induzierten Immunantwort. Hierzu wurde BALB/c-Mäusen in einem Versuchsansatz nackte, stabilisierte mRNA und in einem anderen Versuchsansatz Plasmid-DNA in das Ohr  
 30 injiziert. In beiden Versuchsansätzen enthielt die Nukleinsäuren einen für  $\beta$ -Galactosidase kodierenden Bereich. Im Ergebnis war festzustellen, dass im Fall der mRNA-Vakzinierung überwiegend IgG1-Antikörper produziert wurden, während bei der DNA-Vakzinierung

überwiegend IgG2a-Antikörper gebildet wurden. Erfindungsgemäß konnte damit nachgewiesen werden, dass mRNA-Vakzinierung eine humorale Immunantwort (Th2) hervorruft (Produktion von IgG1), während DNA-Vakzinierung eine zelluläre Immunantwort (Th1) hervorruft (Produktion von IgG2a). Überraschenderweise konnte durch diese Untersuchung den-

5 mach auch festgestellt werden, dass die Entscheidung, ob in einem Säugetier, hier in Mäusen, eine humorale oder zelluläre Immunantwort ausgelöst wird, weder von dem Verabreichungsweg noch von dem Antigen, das durch die Nukleinsäure kodiert wird, abhängig ist, sondern vielmehr von der Art der Nukleinsäure, RNA oder DNA. In weiteren Versuchsansätzen wurden Nukleinsäuren verwendet, die anstelle des  $\beta$ -Galactosidase kodierenden Bereichs einen

10 Bereich enthielten, der für ein Antigen eines Pathogens oder eines Tumorantigens kodierte. Auf solche Antigen kodierenden Bereiche wird nachfolgend näher eingegangen. In diesen Versuchsansätzen zeigten sich ebenfalls die vorangehend beschriebenen Resultate bezüglich der Auslösung einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort. Die Dosierung der erfindungsgemäßen mRNA hängt insbesondere von der zu behandelnden Erkrankung und deren Fortschrittssta-

15 dium, wie auch dem Körpergewicht, dem Alter und dem Geschlecht des Patienten ab (Die Begriffe Organismus, Säugetier, Mensch, Patient werden im Sinne der Erfindung synonym verwendet.). Die Konzentration der erfindungsgemäßen mRNA kann daher innerhalb eines Bereichs von ungefähr 1  $\mu$ g bis 100 mg/ml variieren.

20 Zusätzlich zu dieser Erkenntnis, haben die Erfinder den Einfluss von Cytokinen auf RNA-Vakzinierung untersucht. Cytokine stellen im Zusammenhang mit DNA-Vakzinierungen - wie aus dem Stand der Technik bekannt - ein hervorragendes Adjuvanz dar (19,20,24,25). Ein bevorzugtes Cytokin ist GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), das die Dichte der Dendritischen Zellen (dendritic cells CD<sub>s</sub>) in der Haut erhöht und damit eine

25 durch eine DNA-Vakzinierung hervorgerufene Immunantwort verstärkt. Ziel der erfindungsgemäßen Untersuchungen war es, durch Cytokin-Verabreichung auch eine erfindungsgemäße mRNA-induzierte Immunantwort noch weiter zu verstärken. Die Verabreichung von Cytokinen in Verbindung mit Peptiden (26) und DNA (27) ist im Stand der Technik bekannt. Allerdings konnten zum einen bislang keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden, vermutlich

30 (auch) dadurch, dass ein geeigneter Zeitpunkt für die Verabreichung von GM-CSF nicht festgelegt werden konnte, zum anderen sind Vakzinierungen, die mit Peptiden bzw. DNA durch-

geführt werden, nicht auf RNA-basierten Vakzinierungen übertragbar. Hierauf wurde vorstehend bereits detailliert eingegangen.

Erfindungsgemäß wurden parallele Versuche durchgeführt, in denen die Zugabe eines Cytokins, bevorzugt eine GM-CSF-Zugabe, zu verschiedenen Zeitpunkten vor, nach und gleichzeitig mit einer mRNA-Vakzinierung (wobei die (erfindungsgemäße) mRNA für  $\beta$ -Galactosidase, ein Antigen eines Pathogens oder ein Tumorantigen kodierte) erfolgte. Im Ergebnis blieb festzustellen, dass eine Verabreichung vor der Vakzinierung keinen wesentlichen Effekt auf Qualität oder Quantität (Typ und Menge des produzierten Immunglobulins IgG1/IgG2a) ausübte (siehe Figur 3 für  $\beta$ -Galactosidase). Überraschenderweise konnte erfindungsgemäß jedoch festgestellt werden, dass bei Verabreichung von einem Cytokin, bevorzugt GM-CSF, nach der mRNA-Vakzinierung, nicht nur eine erhöhte Th2-Immunantwort vorlag, sondern darüber hinaus auch eine Th1-Immunantwort induziert wurde (siehe Figur 3 und Tabelle 1). Besonders gute Ergebnisse ergaben sich bei der Verabreichung von einem Cytokin, bevorzugt GM-CSF, vorzugsweise ungefähr 24 Stunden nach der Verabreichung der erfindungsgemäßen mRNA.

Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Verabreichung von CpG DNA vor, nach und gleichzeitig mit der vorangehend beschriebenen mRNA-Vakzinierung erreicht. CpG stellt in der DNA eine relativ seltene Dinukleotidfolge dar, bei der der Cytosinrest häufig methyliert ist, so dass 5-Methylcytosin vorliegt. Die Methylierung des Cytosinrestes hat Auswirkungen auf die Genregulation, wie z.B. die Hemmung der Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Blockade von Promoterstellen usw.) D.h., auch hier lag nicht nur eine erhöhte Th2-Immunantwort vor, sondern darüber hinaus wurde eine Th1-Immunantwort induziert. Auch hier wurden besonders gute Ergebnisse erzielt, wenn die CpG DNA ungefähr 24 Stunden nach der Verabreichung der erfindungsgemäßen mRNA verabreicht wurde. Insbesondere wurde CpG DNA mit dem Motif CpG DNA 1668 mit der Sequenz 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' oder dem Motif CpG 1982 5'-TOC AGG ACT TCT CTC AGG TT-3' in den Versuchen verwendet.

Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Verabreichung von Adjuvanz-mRNA vor, nach und gleichzeitig mit der vorangehend beschriebenen mRNA-Vakzinierung erreicht. Die Ad-



juvanz-mRNA wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren in Schritt (b.) eingesetzt und ist immer chemisch modifiziert. Die Adjuvanz-mRNA aktiviert Zellen des Immunsystems (vornehmlich Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere dendritische Zellen (DC), sowie die Abwehrzellen, bspw. in Form von T-Zellen), besonders stark und stimuliert so das Immunsystem eines Organismus. Die Adjuvanz-mRNA führt hierbei insbesondere zu einer vermehrten Freisetzung von immunsteuernden Cytokinen, bspw. Interleukinen, wie IL-6, IL-12 usw..

Die Dosierung des Cytokins bzw. der CpG DNA bzw. der Adjuvanz-mRNA ist abhängig von der verwendeten erfindungsgemäßen mRNA, die einen für ein Antigen aus einem Pathogen oder einem Tumorantigen kodierenden Bereich enthält, der zu behandelnden Erkrankung, dem Zustand des zu behandelnden Patienten (Gewicht, Größe, Entwicklungsstatus der Erkrankung etc.). Die Dosierungsbandbreite liegt ungefähr in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 300  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ .

„Vakzinierung“ bzw. „Impfung“ bedeutet im allgemeinen die Einbringung eines oder mehrerer Antigene oder im Sinne der Erfindung die Einbringung der genetischen Information für ein oder mehrere Antigen(e) in Form der für das/die Antigen(e) kodierenden erfindungsgemäßen mRNA in einen Organismus, insbesondere in eine/mehrere Zelle/Zellen bzw. Gewebe dieses Organismus. Die so verabreichte erfindungsgemäße mRNA wird in dem Organismus bzw. in dessen Zellen in das Antigen translatiert, d.h. das von der erfindungsgemäßen mRNA kodierte Antigen (auch: antigenes Polypeptid oder antigenes Peptid) wird exprimiert, wodurch eine gegen dieses Antigen gerichtete Immunantwort stimuliert wird.

Eine „Immunstimulation“ oder „Stimulierung einer Immunantwort“ erfolgt in der Regel durch die Infektion eines fremden Organismus (z.B. einem Säugetier, insbesondere einem Mensch) mit einem Pathogen (oder auch pathogenen Organismus). Von einem „Pathogen“ oder „pathogenen Organismus“ im Sinne der Erfindung sind insbesondere Viren und Bakterien, jedoch auch alle anderen Pathogene (wie z.B. Pilze) umfasst. „Antigene“ eines Pathogens sind Substanzen (z.B. Proteine, Peptide, Nukleinsäuren oder Fragmente hiervon) des Pathogens, die in der Lage sind, die Bildung von Antikörpern auszulösen. Ebenfalls umfasst von der Erfindung sind Antigene aus einem Tumor. Hierunter ist zu verstehen, dass das Antigen in mit einem Tumor assoziierten Zellen exprimiert wird. Antigene aus Tumoren sind insbe-

sondere solche, die in den entarteten Zellen selbst produziert werden. Vorzugsweise handelt es sich dabei um auf der Oberfläche der Zellen lokalisierte Antigene. Des Weiteren sind die Antigene aus Tumoren aber auch solche, die in Zellen exprimiert werden, welche nicht selbst (oder ursprünglich nicht selbst) entartet sind (waren), jedoch mit dem in Rede stehenden Tumor assoziiert sind. Dazu gehören bspw. auch Antigene, die mit Tumor-versorgenden Gefä-

5    ßen bzw. deren (Neu-)Bildung zusammenhängen, insbesondere solche Antigene, die mit der Neovaskularisierung oder Angiogenese assoziiert sind, bspw. Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF, usw. Weiterhin umfassen derartige mit einem Tumor zusammenhängende Antigene solche aus Zellen des den Tumor einbettenden Gewebes.

10    Unter einem „Cytokin“ ist ganz allgemein ein Protein zu verstehen, das das Verhalten von Zellen beeinflusst. Die Wirkung von Cytokinen erfolgt über spezifische Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Zu den Cytokinen gehören beispielsweise Monokine, Lymphokine oder auch Interleukine, Interferone, Immunglobuline und Chemokine.

15    „Verabreichen“ der/des erfindungsgemäßen mRNA und des Cytokins bzw. der CpG DNA bzw. der Adjuvanz-mRNA bedeutet, dem zu behandelnden Organismus, vorzugsweise Säugtier, besonders bevorzugt Mensch, eine geeignete Dosis der erfindungsgemäßen mRNA bzw. des Cytokins bzw. der CpG DNA bzw. der Adjuvanz-mRNA zuzuführen. Die Verab-

20    reichung kann auf jede geeignete Weise erfolgen, vorzugsweise über eine Injektion, parenteral, bspw. intravenös, intraarteriell, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal oder intradermal. Ebenso ist eine topische oder orale Verabreichung möglich. Auf die Dosierung der erfindungsgemäßen mRNA bzw. des Cytokins bzw. der CpG DNA bzw. der Adjuvanz-mRNA wurde bereits oben näher eingegangen.

25    Konsequenterweise ist von der vorliegenden Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen, insbesondere von Krebs- bzw. Tumorerkrankungen sowie von viralen und bakteriellen Infektionen, wie beispielsweise Hepatitis B, HIV oder MDR (multi-drug resistance)-Infektionen bzw. eine Vakzinierung zur Prävention der vorstehend genannten

30    Erkrankungen umfasst, welches das Verabreichen der erfindungsgemäßen mRNA und des Cytokins oder der CpG DNA oder der Adjuvanz-mRNA an einen Patienten, insbesondere einen Menschen, umfasst. Hierbei handelt es sich um eine Kombinationstherapie, bei der

erfindungsgemäße mRNA und Cytokin bzw. CpG DNA bzw. der Adjuvanz-mRNA der Erfindung werden gemeinsam, getrennt oder zeitlich abgestuft verabreicht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die/das  
 5 erfindungsgemäße mRNA bzw. Cytokin bzw. CpG DNA bzw. der Adjuvanz-mRNA getrennt bzw. zeitlich abgestuft verabreicht. Hierbei wird in einer besonders bevorzugten Ausführungsform in dem erfindungsgemäßen Verfahren der Schritt b. 1 Minute bis 48 Stunden, bevorzugt 20 Minuten bis 36 Stunden, ebenfalls bevorzugt 30 Minuten bis 24 Stunden, stärker bevorzugt 10 Stunden bis 30 Stunden, am stärksten bevorzugt 12 Stunden bis 28 Stunden,  
 10 insbesondere bevorzugt 20 bis 26 Stunden, nach Schritt a. vorgenommen. Erfindungsgemäß kann das Cytokin bzw. die CpG DNA bzw. die Adjuvanz-mRNA aber auch vor oder gleichzeitig mit der erfindungsgemäßen mRNA verabreicht werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren in  
 15 Schritt a. zusätzlich mindestens ein RNase-Inhibitor, vorzugsweise RNasin oder Aurintricarbonsäure verabreicht. Dies dient dazu, einem Abbau der DNA durch RNasen (RNA-abbauende Enzyme) vorzubeugen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Im-  
 20 munantwort verstärkt bzw. moduliert, besonders bevorzugt von einer Th2-Immunantwort in eine Th1-Immunantwort verändert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die mindestens eine erfindungsgemäße mRNA aus Schritt (a.) des erfindungsgemäßen Verfahrens einen Bereich, der  
 25 für mindestens ein Antigen aus einem Tumor ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 707-AP, AFP, ART-4, BAGE,  $\beta$ -Catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CMV pp65, CT, Cyp-B, DAM, EGFR1, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HBS, HER-2/neu, HLA-A\*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (oder hTRT), Influenza Matrix-Protein, insbesondere Influenza A-  
 30 Matrix-M1-Protein oder Influenza B-Matrix-M1-Protein, iCE, KIAA0205, LAGE, z.B. LAGE-1, LDLR/FUT, MAGE, z.B. MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, MAGE-A1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-10, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2,

-3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR $\alpha$ , PRAME, Proteinase 3, PSA, PSM, PTPRZ1, RAGE, RU1 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, SEC61G, SOX9, SPC1, SSX, Survivin, TEL/AML1, TERT, TNC, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, Tyrosinase und WT1 kodiert.

5

Besonders bevorzugt enthält die mindestens eine erfindungsgemäße mRNA einen Bereich, der für mindestens ein Antigen aus einem Tumor sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus MAGE-A1 [Accession number (Zugriffsnummer) M77481], MAGE-A6 [Accession number NM\_005363], Melan-A [Accession number NM\_005511], GP100 [Accession number M77348], Tyrosinase [Accession number NM\_000372], Survivin [Accession number AF077350], CEA [Accession number NM\_004363], Her-2/neu [Accession number M11730], Mucin-1 [Accession number NM\_002456], TERT [Accession number NM\_003219], PR3 [Accession number NM\_002777], WT1 [Accession number NM\_000378], PRAME [Accession number NM\_006115], TNC (Tenascin C) [Accession number X78565], EGFR1 („Epidermal Growth Factor Receptor 1“) [Accession number AF288738], SOX9 [Accession number Z46629], SEC61G [Accession number NM\_014302], PTPRZ1 (Protein Tyrosine Phosphatase, Rezeptor-Typ, Z-Polypeptid 1) [Accession number NM\_002851], CMV pp65 [Accession number M15120], HBS-Antigen [Accession number E00121], Influenza A-Matrix-M1-Protein Accession number AF348197 und Influenza B-Matrix-M1-Protein Accession number V01099 kodiert.

20

Erfindungsgemäß sind ebenfalls funktionelle Fragmente und/oder funktionelle Varianten einer erfindungsgemäßen mRNA bzw. eines Antigens bzw. eines Cytokins bzw. einer CpG DNA bzw. einer Adjuvanz-mRNA der Erfindung sowie. „Funktionell“ im Sinne der Erfindung bedeutet, dass das Antigen bzw. die erfindungsgemäße mRNA immunologische bzw., immunogene Aktivität aufweist, insbesondere eine Immunantwort in einem Organismus, in dem es fremd ist, auslöst. Die erfindungsgemäße mRNA ist funktionell, wenn sie in ein funktionelles Antigen (oder ein Fragment hiervon) translatiert werden kann.

25

Unter einem „Fragment“ im Sinne der Erfindung ist ein verkürztes Antigen bzw. eine verkürzte mRNA bzw. ein verkürztes Cytokin bzw. eine verkürzte CpG DNA bzw. eine verkürzte Adjuvanz-mRNA der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Es kann sich hierbei um

30

N-terminal, C-terminal oder intrasequentiell verkürzte Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzen handeln.

Die Herstellung erfindungsgemäßer Fragmente ist im Stand der Technik gut bekannt und kann von einem Fachmann unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt werden (siehe z.B. Maniatis et al. (2001), Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Im allgemeinen kann die Herstellung der erfindungsgemäßen Fragmente durch Modifizieren der DNA-Sequenz, die das Wildtyp-Molekül kodiert, gefolgt von einer Transformation dieser DNA-Sequenz in einen geeigneten Wirt und Expression dieser modifizierten DNA-Sequenz, unter der Voraussetzung, dass die Modifikation der DNA die beschriebenen funktionellen Aktivitäten nicht zerstört, durchgeführt werden. Im Falle der erfindungsgemäßen mRNA kann die Herstellung des Fragments ebenfalls durch Modifizieren der Wildtyp-DNA-Sequenz gefolgt von einer *in vitro* Transkription und Isolierung der mRNA erfolgen, ebenfalls unter der Voraussetzung, dass die Modifikation der DNA die funktionelle Aktivität der mRNA nicht zerstört. Die Identifizierung eines erfindungsgemäßen Fragments kann beispielsweise über eine Sequenzierung des Fragments und einem nachfolgenden Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Wildtyp-Sequenz erfolgen. Die Sequenzierung kann anhand von Standardverfahren, die im Stand der Technik zahlreich und gut bekannt sind, erfolgen.

Als „Varianten“ im Sinne der Erfindung werden insbesondere solche Antigene bzw. mRNAs bzw. Cytokine bzw. CpG DNA bzw. Adjuvanz-mRNA bezeichnet, die Sequenzunterschiede zu den entsprechenden Wildtyp-Sequenzen aufweisen. Bei diesen Sequenzabweichungen kann es sich um eine oder mehrere Insertion(en), Deletion(en) und/oder Substitution(en) von Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren handeln, wobei eine Sequenzhomologie von mindestens 60%, bevorzugt 70%, stärker bevorzugt 80%, ebenfalls stärker bevorzugt 85%, noch stärker bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 97% vorliegt.

Um die prozentuale Identität zweier Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen zu bestimmen, können die Sequenzen abgeglichen werden, um nachfolgend miteinander verglichen zu werden. Hierfür können z.B. Lücken in die Sequenz der ersten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenz eingeführt werden und die Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren an der entspre-

chenden Position der zweiten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenz verglichen werden. Wenn eine Position in der ersten Aminosäuresequenz mit der gleichen Aminosäure bzw. der gleichen Nukleinsäure besetzt ist, wie es an einer Position in der zweiten Sequenz der Fall ist, dann sind beide Sequenzen an dieser Position identisch. Die prozentuale Identität zwischen  
5 zwei Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl identischer Positionen geteilt durch die Sequenzen.

Die Bestimmung der prozentualen Identität zweier Sequenzen kann anhand eines mathematischen Algorithmus durchgeführt werden. Ein bevorzugtes, jedoch nicht beschränkendes,  
10 Beispiel eines mathematischen Algorithmus, der für den Vergleich zweier Sequenzen herangezogen werden kann, ist der Algorithmus von Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Ein solcher Algorithmus ist in dem NBLAST-Programm integriert, mit dem Sequenzen identifiziert werden können, die eine gewünschte Identität zu den Sequenzen der vorliegenden Erfindung besitzen. Um einen Lücken-Abgleich (auch "gapped alignment"), wie oben  
15 beschrieben, zu erhalten, kann das "Gapped BLAST"-Programm verwendet werden, wie in Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 beschrieben.

Funktionelle Varianten im Sinne der Erfindung, können vorzugsweise erfindungsgemäße mRNA-Moleküle oder Adjuvanz-mRNA-Moleküle sein, die eine erhöhte Stabilität und/oder  
20 Translationsrate gegenüber ihren Wildtyp-Molekülen aufweisen. Ebenfalls kann ein besserer Transport in die Zelle des (Wirts-)Organismus vorliegen.

Unter den Begriff Varianten fallen insbesondere solche Aminosäuresequenzen, die gegenüber den physiologischen Sequenzen konservative Substitution aufweisen. Als konservative Substitutionen werden solche Substitutionen bezeichnet, bei denen Aminosäuren gegeneinander  
25 ausgetauscht werden, die aus der gleichen Klasse stammen. Insbesondere gibt es Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, positiv oder negativ geladenen Seitenketten, aromatischen Gruppen in der Seitenketten oder Aminosäuren, deren Seitenketten Wasserstoffbrücken eingehen können, bspw. Seitenketten, die eine Hydroxyfunktion besitzen. Das bedeutet, dass  
30 bspw. eine Aminosäure mit einer polaren Seitenkette durch eine andere Aminosäure mit einer gleichfalls polaren Seitenkette ersetzt wird oder beispielsweise eine durch eine hydrophobe Seitenkette gekennzeichnete Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit gleichfalls hyd-

rophober Seitenkette substituiert wird (z.B. Serin (Threonin) durch Threonin (Serin) bzw. Leucin (Isoleucin) durch Isoleucin (Leucin)). Insertionen und Substitutionen sind insbesondere an solchen Sequenzpositionen möglich, die keine Veränderung der dreidimensionalen Struktur hervorrufen oder den Bindungsbereich betreffen. Eine Veränderung einer dreidimensionalen Struktur durch Insertion(en) oder Deletion(en) ist bspw. mit Hilfe von CD-Spektren (Zirkulardichroismus-Spektren) leicht überprüfbar (Urry, 1985, Absorption, circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam).

- 10 Ebenfalls umfasst sind Varianten, bei denen ein „codon usage“ erfolgt. Jede Aminosäure wird durch ein Codon, das durch jeweils drei Nukelotide (Triplett) definiert wird, kodiert. Es ist möglich, ein Codon, das eine bestimmte Aminosäure kodiert, gegen ein anderes Codon, das dieselbe Aminosäure kodiert, auszutauschen. Durch die Wahl geeigneter alternativer Codons kann beispielsweise die Stabilität der erfindungsgemäßen mRNA erhöht werden. Hierauf wird  
15 nachstehend noch näher eingegangen.

- Geeignete Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Varianten mit Aminosäuresequenzen, die gegenüber den Wildtyp-Sequenzen Substitutionen aufweisen, werden bspw. in den Druckschriften US 4,737,462, US 4,588,585, US 4,959,314, US 5,116,943, US 4,879,111  
20 und US 5,017,691 offenbart. Die Herstellung von Varianten im allgemeinen wird insbesondere auch von Maniatis et al, (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben. Es können hierbei Codons weggelassen, ergänzt oder ausgetauscht werden. Varianten im Sinne der Erfindung können ebenfalls hergestellt werden, indem in die Nukleinsäuren, welche für die Varianten kodieren, Veränderungen eingeführt  
25 werden, wie bspw. Insertionen, Deletionen und/oder Substitutionen einer oder mehrerer Nukleotide. Im Stand der Technik sind zahlreiche Verfahren für derartige Veränderungen von Nukleinsäuresequenzen bekannt. Eine der meist verwendeten Technik ist die Oligonukleotid-gerichtete Orts-spezifische Mutagenese (siehe Comack B., Current Protocols in Molecular Biology, 8.01-8.5.9, Ausubel F. et al., Aufl. 1991). Bei dieser Technik wird ein Oligonukleotid synthetisiert, dessen Sequenz eine bestimmte Mutation aufweist. Dieses Oligonukleotid wird dann mit einem Template hybridisiert, das die Wildtyp-Nukleinsäuresequenz  
30 enthält. Bevorzugt wird bei dieser Technik ein einzelsträngiges Template verwendet. Nach

dem Annealing von Oligonukleotid und Template, wird eine DNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, um den zweiten Strang des Oligonukleotids, der komplementär zu dem Template-DNA-Strang ist, zu synthetisieren. Als Ergebnis wird ein Heteroduplex-Molekül erhalten, welches eine Fehlpaarung enthält, die durch die oben erwähnte Mutation in dem Oligonukleotid entsteht. Die Oligonukleotidsequenz wird in ein geeignetes Plasmid eingeführt, dieses wird in eine Wirtszelle eingeführt und in dieser Wirtszelle wird die Oligonukleotid-DNA repliziert. Mit dieser Technik erhält man Nukleinsäuresequenzen mit gezielten Veränderungen (Mutationen), welche für die Herstellung von Varianten gemäß der Erfindung verwendet werden können.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das mindestens eine Cytokin ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus IL-1 ( $\alpha/\beta$ ), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ , MCAF, RANTES, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  und besonders bevorzugt G-CSF oder GM-CSF besteht, insbesondere (rekombinante oder nicht-rekombinante) der humanen Formen der vorgenannten Cytokine. In einer bevorzugten Ausführungsform liegen die Cytokine als RNA bzw. RNA-Konstrukte vor.

15

Die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des Verfahrens gemäß der Erfindung kann als nackte mRNA vorliegen. Bevorzugt liegt die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens als Globin-UTR (untranslated regions)-stabilisierte mRNA, insbesondere als  $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierte mRNA, vor.

20

Es konnte erfindungsgemäß festgestellt werden, dass die Injektion von nackter  $\beta$ -Globin-UTR (untranslated regions)-stabilisierter erfindungsgemäße mRNA in die Ohrmuschel eines Säugetiers (z.B. von Mäusen) eine spezifische Immunantwort gegen das Antigen, das durch die erfindungsgemäße mRNA kodiert wird, induziert (17). Mit anderen Worten, haben die Erfinder den Verlauf der injizierten  $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierten mRNA und den Typ der Immunantwort, den sie auslöst, verfolgt bzw. untersucht und so eine Translation *in vivo* nachgewiesen (siehe Figur 1). Diese Vakzinierungsstrategie wurde weiter untersucht und es wurde eine pharmazeutische mRNA entwickelt, die in humanen klinischen Versuchen verwendet werden kann.

25

30



In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens als modifizierte mRNA, insbesondere stabilisierte mRNA, vorliegen. Modifikationen der erfindungsgemäßen mRNA dienen hierbei vor allem der Erhöhung der Stabilität der erfindungsgemäße mRNA aber auch der Verbesserung des Transfers der erfindungsgemäße mRNA in eine Zelle bzw. ein Gewebe eines Organismus. Vorzugsweise weist die erfindungsgemäße mRNA des erfindungsgemäßen Verfahrens eine oder mehrere Modifikationen, insbesondere chemische Modifikationen, auf, die zur Erhöhung der Halbwertszeit der erfindungsgemäße mRNA im Organismus beitragen bzw. den Transfer der erfindungsgemäße mRNA in die Zelle bzw. ein Gewebe verbessern.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der Wildtyp-RNA erhöht, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA gegenüber der kodierten Aminosäuresequenz der Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.

Diese Modifikation beruht auf der Tatsache, dass für die effiziente Translation einer mRNA die Sequenzabfolge des zu translatierenden Bereichs der mRNA wesentlich ist. Bedeutungsvoll ist hier die Zusammensetzung und die Abfolge der verschiedenen Nukleotide. Insbesondere sind Sequenzen mit erhöhtem G (Guanosin)/C (Cytosin)-Gehalt stabiler als Sequenzen mit einem erhöhten A (Adenosin)/U (Uracil)-Gehalt. Daher werden erfindungsgemäß unter Beibehaltung der translatierten Aminosäureabfolge die Codons gegenüber der Wildtyp-mRNA derart variiert, dass sie vermehrt G/C-Nukleotide beinhalten. Aufgrund der Tatsache, dass mehrere Codons für ein und dieselbe Aminosäure kodieren (sog. „Degeneration des genetischen Codes“), können die für die Stabilität günstigsten Codons ermittelt werden (sog. „alternative Codonverwendung“ oder englisch: „codon usage“).

In Abhängigkeit von der durch die modifizierte erfindungsgemäße mRNA zu kodierenden Aminosäure sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Modifikation der erfindungsgemäßen mRNA-Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz möglich. Im Fall von Aminosäuren, die

durch Codons kodiert werden, die ausschließlich G- oder C- Nukleotide enthalten, ist keine Modifikation des Codons erforderlich. So erfordern die Codons für Pro (CCC oder CCG), Arg (CGC oder CGG), Ala (GCC oder GCG) und Gly (GGC oder GGG) keine Veränderung, da kein A oder U vorhanden ist.

5

Dem entgegen können Codons, welche A- und/oder U-Nukleotide enthalten durch Substitution anderer Codons, welche die gleichen Aminosäuren kodieren, jedoch kein A und/oder U enthalten, verändert werden. Beispiele hierfür sind:

- 10 - die Codons für Pro können von CCU oder CCA zu CCC oder CCG verändert werden;
- die Codons für Arg können von CGU oder CGA oder AGA oder AGG zu CGC oder CCG verändert werden;
- die Codons für Ala können von GCU oder GCA zu GCC oder GCG verändert werden;
- die Codons für Gly können von GGU oder GGA zu GGC oder GGG verändert werden.

15

In anderen Fällen können A- bzw. U-Nukleotide zwar nicht aus den Codons eliminiert werden, jedoch ist es möglich, den A- und U-Gehalt zu verringern, indem Codons verwendet werden, die einen geringeren Anteil A- und/oder U-Nukleotide enthalten. Beispiele hierfür sind:

20

- die Codons für Phe können von UUU zu UUC verändert werden;
- die Codons für Leu können von UUA, UUG, CUU oder CUA zu CUC oder CUG verändert werden;
- die Codons für Ser können von UCU oder UCA oder AGU zu UCC, UCG oder AGC verändert werden;

25

- das Codon für Tyr kann von UAU zu UAC verändert werden;
- das Codon für Cys kann von UGU zu UGC verändert werden;
- das Codon His kann von CAU zu CAC verändert werden;
- das Codon für Gln kann von CAA zu CAG verändert werden;

30

- die Codons für Ile können von AUU oder AUA zu AUC verändert werden;
- die Codons für Thr können von ACU oder ACA zu ACC oder ACG verändert werden;
- das Codon für Asn kann von AAU zu AAC verändert werden;

- das Codon für Lys kann von AAA zu AAG verändert werden;
- die Codons für Val können von GUU oder GUA zu GUC oder GUG verändert werden;
- das Codon für Asp kann von GAU zu GAC verändert werden;
- das Codon für Glu kann von GAA zu GAG verändert werden,
- 5 - das Stop-Codon UAA kann zu UAG oder UGA verändert werden.

Im Falle der Codons für Met (AUG) und Trp (UGG) besteht hingegen keine Möglichkeit der Sequenzmodifikation.

- 10 Die vorstehend aufgeführten Substitutionen können sowohl einzeln aber auch in allen möglichen Kombinationen zur Erhöhung des G/C-Gehalts der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA gegenüber der Wildtyp-mRNA (der ursprünglichen Sequenz) verwendet werden. So können beispielsweise alle in der Wildtyp-Sequenz auftretenden Codons für Thr zu ACC (oder ACG) verändert werden. Bevorzugt werden jedoch beispielsweise Kombinationen der
- 15 vorstehenden Substitutionsmöglichkeiten verwendet:

- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz (Wildtyp-mRNA) für Thr kodierenden Codons zu ACC (oder ACG) und Substitution aller ursprünglich für Ser kodierenden Codons zu UCC (oder UCG oder AGC);

20

- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Ile kodierenden Codons zu AUC und Substitution aller ursprünglich für Lys kodierenden Codons zu AAG und Substitution aller ursprünglich für Tyr kodierenden Codons zu UAC;

25

- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val kodierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Glu kodierenden Codons zu GAG und Substitution aller ursprünglich für Ala kodierenden Codons zu GCC (oder GCG) und Substitution aller ursprünglich für Arg kodierenden Codons zu CGC (oder CGG);

30

- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val kodierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Glu kodierenden Codons zu GAG und Substitution aller ursprünglich für Ala kodierenden Codons zu GCC (oder GCG)

und Substitution aller ursprünglich für Gly kodierenden Codons zu GGC (oder GGG) und Substitution aller ursprünglich für Asn kodierenden Codons zu AAC;

- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val kodierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Phe kodierenden Codons zu UUC und Substitution aller ursprünglich für Cys kodierenden Codons zu UGC und Substitution aller ursprünglich für Leu kodierenden Codons zu CUG (oder CUC) und Substitution aller ursprünglich für Gln kodierenden Codons zu CAG und Substitution aller ursprünglich für Pro kodierenden Codons zu CCC (oder CCG);

usw.

Vorzugsweise wird der G/C-Gehalt des für das Antigen kodierenden Bereichs der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA um mindestens 7%-Punkte, mehr bevorzugt um mindestens 15%-Punkte, besonders bevorzugt um mindestens 20%-Punkte gegenüber dem G/C-Gehalt des kodierten Bereichs der für das Antigen kodierenden Wildtyp-mRNA erhöht.

Besonders bevorzugt ist es in diesem Zusammenhang, den G/C-Gehalt der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA, insbesondere in dem für das Antigen kodierenden Bereich, im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz maximal zu erhöhen.

Eine weitere bevorzugte Modifikation der mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens basiert auf der Erkenntnis, dass die Translationseffizienz ebenfalls durch eine unterschiedliche Häufigkeit im Auftreten von tRNAs in Zellen bestimmt wird. Sind daher in einer RNA-Sequenz vermehrt sogenannte "seltene" Codons vorhanden, so wird die entsprechende mRNA deutlich schlechter translatiert als in dem Fall, dass für relativ "häufige" tRNAs kodierende Codons vorhanden sind.

Somit wird in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA des erfindungsgemäßen Verfahrens, der für das Antigen kodierende Bereich gegenüber dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-mRNA derart verändert, dass mindestens ein Codon der Wildtyp-Sequenz, das für eine in der Zelle relativ seltene tRNA kodiert, gegen ein Codon ausgetauscht, das für eine in

der Zelle relativ häufige tRNA kodiert, welche die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA. Durch diese Modifikation werden die RNA-Sequenzen derart modifiziert, dass Codons eingefügt werden, für die häufig vorkommende tRNAs zur Verfügung stehen. Anders ausgedrückt, können durch diese Modifikation erfindungsgemäß alle Codons der Wild-

5 typ-Sequenz, die für eine in der Zelle relativ seltene tRNA kodieren, jeweils gegen ein Codon ausgetauscht werden, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA kodiert, welche jeweils die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA.

Welche tRNAs relativ häufig in der Zelle auftreten und welche demgegenüber relativ selten

10 auftreten, ist einem Fachmann bekannt; vgl. bspw. Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, den in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA erhöhten, insbesondere maximalen, sequenziellen G/C-Anteil mit den "häufigen"

15 Codons zu verknüpfen, ohne die Aminosäuresequenz des durch den kodierenden Bereich der mRNA kodierten Antigens zu verändern. Diese bevorzugte Ausführungsform stellt eine besonders effizient translatierte und stabilisierte erfindungsgemäße mRNA bspw. für das erfindungsgemäße Verfahren bereit.

20 Die Ermittlung einer wie vorstehend beschrieben modifizierten erfindungsgemäßen mRNA (Erhöhung des G/C-Gehalts; Austausch von tRNAs) kann anhand des in der WO 02/098443 – deren Offenbarungsgehalt vollinhaltlich in die vorliegende Erfindung einbezogen wird – erläuterten Computerprogramms ermittelt werden. Mit diesem Computerprogramm kann anhand des genetischen Codes bzw. dessen degenerativer Natur die Nucleotid-

25 Sequenz einer beliebigen mRNA derart modifiziert werden, dass sich ein maximaler G/C-Gehalt in Verbindung mit der Verwendung von Codons, die für möglichst häufig in der Zelle vorkommende tRNAs kodieren, ergibt, wobei die durch die modifizierte mRNA kodierte Aminosäure-Sequenz gegenüber der nicht-modifizierten Sequenz vorzugsweise nicht verändert ist. Alternativ kann auch nur der G/C-Gehalt oder nur die Codonverwendung gegenüber

30 der ursprünglichen Sequenz modifiziert werden. Der Quellcode in Visual Basic 6.0 (eingesetzte Entwicklungsumgebung: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 mit Servicepack 3) ist ebenfalls in der WO 02/098443 angegeben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der Wildtyp-mRNA erhöht. Diese Modifikation (ein erhöhter A/U-Gehalt um die Ribosomen-Bindungsstelle) erhöht die Effizienz der Ribosomen-Bindung an die erfindungsgemäße mRNA. Eine wirksame Bindung der Ribosomen an die Ribosomen-Bindungsstelle (Kozak-Sequenz: GCCGCCACCAUGG, das AUG bildet das Startcodon) bewirkt wiederum eine effiziente Translation der erfindungsgemäßen mRNA.

Eine ebenfalls bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei der kodierende Bereich und/oder der 5'- und/oder 3'-nicht-translatierte Bereich der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) gegenüber der Wildtyp-mRNA derart verändert ist, dass er keine destabilisierenden Sequenzelemente enthält, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA gegenüber der Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist. Es ist bekannt, dass beispielsweise in den Sequenzen eukaryotischer mRNAs destabilisierende Sequenzelemente (DSE) auftreten, an welche Signalproteine binden und den enzymatischen Abbau der mRNA *in vivo* regulieren. Daher können zur weiteren Stabilisierung der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA gegebenenfalls im für das Antigen kodierenden Bereich ein oder mehrere derartige Veränderungen gegenüber dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-mRNA vorgenommen werden, so dass dort keine bzw. im wesentlichen keine destabilisierenden Sequenzelemente enthalten sind. Durch derartige Veränderungen können erfindungsgemäß ebenfalls in den nicht-translatierten Bereichen (3'- und/oder 5'-UTR) vorhandene DSE aus der erfindungsgemäßen mRNA eliminiert werden.

Derartige destabilisierende Sequenzen sind bspw. AU-reiche Sequenzen ("AURES"), die in 3'-UTR-Abschnitten zahlreicher instabiler mRNA vorkommen (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 bis 1674). Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren enthaltenen erfindungsgemäßen mRNA-Moleküle sind daher vorzugsweise derart gegenüber der Wildtyp-mRNA verändert, dass sie keine derartigen destabilisierenden Sequenzen aufweisen. Dies gilt

auch für solche Sequenzmotive, die von möglichen Endonucleasen erkannt werden, bspw. die Sequenz GAACAAG, die im 3' UTR-Segment des für den Transferin-Rezeptor kodierenden Gens enthalten ist (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969 bis 1980). Auch diese Sequenzmotive werden bevorzugt in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA des erfindungsgemäßen Verfahrens entfernt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens eine 5'-Cap-Struktur auf. Beispiele von Cap-Strukturen, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind m<sup>7</sup>G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A und G(5')ppp(5')G.

Ferner ist es bevorzugt, dass die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens einen Poly(A)-Schwanz, vorzugsweise von mindestens 25 Nukleotiden, stärker bevorzugt von mindestens 50 Nukleotiden, noch stärker bevorzugt von mindestens 70 Nukleotiden, ebenfalls stärker bevorzugt von mindestens 100 Nukleotiden, am stärksten bevorzugt von mindestens 200 Nukleotiden aufweist.

Ebenfalls bevorzugt weist die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens eine IRES und/oder mindestens eine 5'-und/oder 3'-Stabilisierungssequenz auf. Erfindungsgemäß können demnach in die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) eine oder mehrere sog. IRES (engl. „internal ribosomal entry site“) eingefügt werden. Eine IRES kann so als alleinige Ribosomen-Bindungsstelle fungieren, sie kann jedoch auch zur Bereitstellung einer mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) dienen, die mehrere Antigene kodiert, die unabhängig voneinander durch die Ribosomen translatiert werden sollen ("multicistronische mRNA"). Beispiele erfindungsgemäß verwendbarer IRES-Sequenzen sind diejenigen aus Picornaviren (z.B. FMDV), Pestviren (CFFV), Polioviren (PV), Enzephalo-Myocarditis-Viren (ECMV), Maul-und-Klauenseuche-Viren (FMDV), Hepatitis-C-Viren (HCV), Klassisches-Schweinefieber-Viren (CSFV), Murines-Leukoma-Virus (MLV), Simean-Immundefizienz-Viren (SIV) oder Cricket-Paralysis-Viren (CrPV).

Weiterhin bevorzugt weist die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens eine 5'- und/oder 3'-Stabilisierungssequenz auf. Diese Stabilisierungssequenzen in den 5'- und/oder 3'- nicht-translatierten Bereichen bewirken eine Erhöhung der Halbwertszeit der erfindungsgemäßen mRNA im Cytosol. Diese Stabilisierungssequenzen können eine 100%ige Sequenzhomologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen, die in Viren, Bakterien und Eukaryoten auftreten, aufweisen, können aber auch teilweise oder vollständig synthetischer Natur sein. Als Beispiel für stabilisierende Sequenzen, die in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, können die nicht-translatierten Sequenzen (UTR) des  $\beta$ -Globins, bspw. von *Homo sapiens* oder *Xenopus laevis*, genannt werden.

Ein anderes Beispiel einer Stabilisierungssequenz weist die allgemeine Formel  $(C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC$  auf, die im 3'UTR der sehr stabilen mRNA enthalten ist, die für  $\alpha$ -Globin,  $\alpha$ -(I)-Collagen, 15-Lipoxygenase oder für Tyrosin-Hydroxylase kodiert (vgl. Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 bis 2414). Selbstverständlich können derartige Stabilisierungssequenzen einzeln oder in Kombination miteinander als auch in Kombination mit anderen, einem Fachmann bekannten Stabilisierungssequenzen verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens ein Analoges natürlich vorkommender Nukleotide auf. Dieses/diese Analoges/Analoge dient/dienen der weiteren Stabilisierung der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA, wobei dies auf der Tatsache beruht, dass die in den Zellen vorkommenden RNA-abbauenden Enzyme als Substrat vorzugsweise natürlich vorkommende Nukleotide erkennen. Durch Einfügen von Nukleotid-Analoga in die RNA kann daher der RNA-Abbau erschwert werden, wobei die Auswirkung auf die Translationseffizienz bei Einfügen dieser Analoga, insbesondere in den kodierenden Bereich der mRNA, einen positiven oder negativen Effekt auf die Translationseffizienz haben kann. In einer keineswegs abschließenden Aufzählung können als Beispiele erfindungsgemäß verwendbarer Nukleotidanaloga Phosphoramidate, Phosphorthioate, Peptidnukleotide, Methylphosphonate, 7-Deazaguanosin, 5-Methylcytosin und Inosin genannt werden. Die Herstellung derartiger Analoga sind einem Fachmann bspw. aus den US-Patenten 4,373,071, US 4,401,796, US 4,415,732, US 4,458,066, US 4,500,707, US 4,668,777, US 4,973,679, US 5,047,524, US 5,132,418, US 5,153,319, US 5,262,530 und 5,700,642 be-



kannt. Erfindungsgemäß können derartige Analoga in nicht-translatierten und translatierten Bereichen der modifizierten mRNA vorkommen.

Einem Fachmann sind verschiedene Verfahren geläufig, die beschriebenen Modifikationen vorzunehmen. Einige dieser Verfahren wurden bereits in dem obigen Abschnitt zu den Varianten der Erfindung beschrieben. Beispielsweise kann zur Substitution von Codons in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA im Falle kürzerer kodierender Bereiche die gesamte erfindungsgemäße mRNA chemisch unter Verwendung von Standardtechniken synthetisiert werden.

Bevorzugt werden allerdings Substitutionen, Additionen oder Eliminierungen von Basen unter Verwendung einer DNA-Matrize zur Herstellung der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA mit Hilfe von Techniken der gängigen zielgerichteten Mutagenese eingeführt (siehe z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl., Cold Spring Harbor, NY, 2001). Bei einem solchen Verfahren wird zur Herstellung der erfindungsgemäßen mRNA ein entsprechendes DNA-Molekül *in vitro* transkribiert. Diese DNA-Matrize besitzt einen geeigneten Promotor, bspw. einen T7 -oder SP6-Promotor, für die *in vitro* Transkription, dem die gewünschte Nukleotidsequenz für die herzustellende erfindungsgemäße mRNA und ein Terminationsignal für die *in vitro* Transkription folgen. Erfindungsgemäß wird das DNA-Molekül, das die Matrize des herzustellenden RNA-Konstrukts bildet, durch fermentative Vermehrung und anschließende Isolierung als Teil eines in Bakterien replizierbaren Plasmids hergestellt. Als für die vorliegende Erfindung geeignete Plasmide können bspw. die Plasmide pT7Ts (GenBank-Zugriffsnummer U26404; Lai et al., Development 1995, 121: 2349 bis 2360), pGEM<sup>®</sup>-Reihe, bspw. pGEM<sup>®</sup>-1 (GenBank-Zugriffsnummer X65300; von Promega) und pSP64 (GenBank-Zugriffsnummer X65327) genannt werden; vgl. auch Mezei und Storts, Purification of PCR Products, in: Griffin und Griffin (Hrsg.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

Es kann so unter Verwendung kurzer synthetischer DNA-Oligonukleotide, die an den entstehenden Schnittstellen kurze einzelsträngige Übergänge aufweisen, oder durch chemische Synthese hergestellte Gene die gewünschte Nukleotidsequenz nach einem Fachmann geläufi-

gen molekularbiologischen Methoden in ein geeignetes Plasmid cloniert werden (vgl. Maniatis et al., supra). Das DNA-Molekül wird dann aus dem Plasmid, in welchem es in einfacher oder mehrfacher Kopie vorliegen kann, durch Verdauung mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten.

5

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit mindestens einem kationischen oder polykationischen Agens komplexiert oder kondensiert ist. Bevorzugt handelt es sich bei einem solchen kationischen oder polykationischen Agens um ein Agens, das aus der Gruppe bestehend aus Protamin, Poly-L-Lysin, Poly-L-Arginin und Histonen ausgewählt ist.

10

Durch diese Modifikation der erfindungsgemäßen mRNA kann der wirksame Transfer der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA in die zu behandelnden Zellen bzw. das zu behandelnde Gewebe bzw. den zu behandelnden Organismus dadurch verbessert werden, dass die modifizierte erfindungsgemäße mRNA mit einem kationischen Peptid oder Protein assoziiert oder daran gebunden ist. Insbesondere ist dabei die Verwendung von Protamin als polykationisches, Nukleinsäure-bindendes Protein besonders wirksam. Die Verwendung anderer kationischer Peptide oder Proteine, wie Poly-L-Lysin oder Histonen, ist selbstverständlich ebenfalls möglich. Diese Vorgehensweise zur Stabilisierung der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA wird beispielsweise in EP-A-1083232 beschrieben, deren diesbezüglicher Offenbarungsgehalt in die vorliegende Erfindung vollumfänglich eingeschlossen ist.

15

20

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die modifizierte erfindungsgemäße mRNA des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Polyethylenimin (PEI) stabilisiert.

25

Sowohl die erfindungsgemäße mRNA als auch die modifizierte erfindungsgemäße mRNA kann einzel- oder doppelsträngig vorliegen.

30

Sämtliche der, unter Bezugnahme auf die erfindungsgemäße mRNA aus Schritt (a.), voranstehend beschriebenen Modifikationen (z.B. Einführung von Nukleotidanaloga, 5'-Cap-

Stuktur usw.), finden im Sinne der Erfindung ebenfalls auf die Adjuvanz-mRNA aus Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens Anwendung.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Adjuvanz-mRNA um relativ kurze RNA-Moleküle, die bspw. aus etwa 2 bis etwa 1.000 Nukleotiden, vorzugsweise aus etwa 8 bis etwa 200 Nukleotiden, besonders bevorzugt aus 15 bis etwa 31 Nukleotiden, besteht.

Erfindungsgemäß kann die Adjuvanz-mRNA ebenfalls einzel- oder doppelsträngig vorliegen.

10 Dabei kann insbesondere doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 Nucleotiden auch als Interferenz-RNA eingesetzt werden, um spezifisch Gene, z.B. von Tumorzellen, auszuschalten, und so diese Zellen gezielt abzutöten oder um darin aktive, für eine maligne Entartung verantwortlich zu machende Gene zu inaktivieren (Elbashir et al., Nature 2001, 411, 494-498).

15

Die vorstehend beschriebenen, sämtlichen Modifikationen der erfindungsgemäßen mRNA bzw. der Adjuvanz-mRNA des erfindungsgemäßen Verfahrens können im Sinne der Erfindung einzeln oder in Kombinationen miteinander auftreten.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Erzeugnis, enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und mindestens ein Cytokin oder mindestens eine CpG DNA oder mindestens einer Adjuvanz-mRNA als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung bei der Behandlung und/oder  
25 Prophylaxe von Krebserkrankungen, Tumorerkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, viralen und/oder bakteriellen Infektionen.

Die Bestandteile des erfindungsgemäßen Erzeugnisses: mindestens eine erfindungsgemäße mRNA enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein  
30 Tumorantigen kodierenden Bereich (1. Bestandteil) und mindestens ein Cytokin oder mindestens eine CpG DNA oder mindestens eine Adjuvanz-mRNA (2. Bestandteil), stehen durch ihre zielgerichtete Verwendung in funktioneller Einheit. Die Bestandteile des Erzeugnisses

können die oben beschriebene, erfindungsgemäße, vorteilhafte Wirkung nicht unabhängig voneinander entfalten, so dass trotz der räumlichen Trennung der Bestandteile 1 und 2 (zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Verabreichung) ihre Anwendung als neues, nicht im Stand der Technik beschriebenes Kombinationserzeugnis vorliegt.

5

Ein erfindungsgemäßes Erzeugnis kann alle Bestandteile, Substanzen und Ausführungsformen umfassen, wie sie in einem Verfahren bzw. Therapieverfahren bzw. Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen bzw. Kombinationstherapieverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Kit, das mindestens eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und mindestens ein Cytokin oder mindestens eine CpG DNA oder mindestens eine Adjuvanz-mRNA enthält, wobei die mindestens eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und das mindestens eine Cytokin oder mindestens eine CpG DNA oder mindestens eine Adjuvanz-mRNA voneinander getrennt sind.

15

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des Kits zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen, Tumor Erkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, und/oder viralen und/oder bakteriellen Infektionen, wie beispielsweise Hepatitis B, HIV oder MDR (multi-drug resistance)-Infektionen.

20

Die in der nachfolgenden Beschreibung der Figuren sowie in den nachfolgenden Beispielen genannte mRNA betrifft die erfindungsgemäße mRNA.

25

## Figuren

**Figur 1** zeigt die *in vivo* Translation von injizierter erfindungsgemäßer mRNA. Mäusen wurden in die Ohrmuschel Injektionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES) („Puffer“),  $\beta$ -Galactosidase kodierende  $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierte mRNA, verdünnt in Injektionspuffer, („Lac Z mRNA“) oder  $\beta$ -Galactosidase kodie-

30

rende DNA in PBS („lacZ DNA“) injiziert. 16 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse getötet, die Ohren wurden rasiert, entfernt und in Einbettungsmedium eingefroren. Dann wurden Gefrierabschnitte angefertigt, fixiert und über Nacht mit X-Gal enthaltender Lösung angefärbt. Zellen, die  $\beta$ -Galactosidase exprimierten, erschienen blau. Die Anzahl der in jeden Abschnitt detektierten blauen Zellen wird in den Diagrammen (linke Hälfte der Figur 1) dargestellt. Auf der X-Achse ist die Länge des analysierten Ohrabschnitts aufgetragen (0 ist willkürlich dem ersten Abschnitt, zugeordnet, der blaue Zellen zeigt; bei den mit Puffer injizierten Mäusen, wurde der Bereich, der 2 mm um die Injektionsstelle lag, analysiert und die 0 willkürlich bestimmt): Jeder Abschnitt beträgt 50  $\mu$ m und somit decken einige aufeinanderfolgende Abschnitte eine Gesamtdistanz von einigen Millimetern ab. In jedem der Diagramme (Puffer-injizierte Mäuse, mRNA-injizierte Mäuse, DNA-injizierte Mäuse) sind die beiden Abschnitte, die durch einen Stern und eine graue Säule gekennzeichnet sind, die Abschnitte, die in den begleitenden Mikroskopie-Abbildungen (rechte Hälfte der Figur 1) dargestellt sind. Hier zeigen offene Pfeile eine endogene Expression der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität hauptsächlich in den Ohrfollikeln an. Diese endogene Aktivität ist durch eine sehr schwache und diffuse Blaufärbung erkennbar. Schwarz ausgefüllte Pfeile zeigen blaue Zellen an, die aus der Aufnahme und Translation einer  $\beta$ -Galactosidase kodierenden exogenen Nukleinsäure resultieren. Solche Zellen sind an der Injektionsstelle in der Dermis lokalisiert und zeigen eine starke Blaufärbung. Einzelne Abschnitte wurden fotografiert. Die Abschnitte mit den meisten blauen Zellen werden dargestellt (sie entsprechen den Abschnitten, die in den Diagrammen mit einem Stern markiert sind). Die Anzahl der blauen Zellen in jedem der aufeinanderfolgenden Abschnitte wird auf den Y-Achsen in den Diagrammen (linke Hälfte der Figur 1) dargestellt.

## Figur 2

zeigt die Auslösung einer Antigen-spezifischen Immunantwort des Typs Th2, durch die Injektion von mRNA. Mäuse wurden vakziniert und verstärkt („boosted“) mit mRNA oder DNA, die für  $\beta$ -Galactosidase kodiert, oder ihnen wurde Injektionspuffer injiziert. Zwei Wochen später erhielten die Mäuse

eine Auffrischungsinjektion (Boost-Injektion). Wiederum zwei Wochen später wurde die Menge an  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen Antikörpern, die in dem Serum vorhanden waren, durch ELISA unter Verwendung von Isotyp-spezifischen Reagenzien bestimmt. Die linke Hälfte der Figur 2 zeigt die IgG1-Produktion, die rechte Hälfte der Figur 2 zeigt die IgG2a-Produktion. (■) zeigt die Kurve für DNA-injizierte Mäuse, (▲) zeigt die Kurve für RNA-injizierte Mäuse und (◆) zeigt die Kurve für Mäuse, die mit Injektionspuffer injiziert wurden.

### Figur 3

zeigt die Polarisierung einer Th2-Immunantwort in eine Th1-Immunantwort, verursacht durch die Injektion von GM-CSF. Alle dargestellten Ergebnisse betreffen Mäuse der gleichen Gruppe in einem Experiment. Die Gesamtanzahl der Mäuse, die in vier unabhängigen Experimenten eine Immunantwort zeigten, wird in Tabelle 1 (Figur 4) dargestellt.

#### Figur 3a:

Den Mäusen wurde entweder  $\beta$ -Galactosidase, emulgiert in Freund's Adjuvanz, oder mRNA, die für  $\beta$ -Galactosidase kodiert, oder Injektionspuffer (als Negativkontrolle) injiziert. GM-CSF (Gesamtmenge 2  $\mu$ g rekombinantes Protein: ca.  $10^4$  U (Units)) wurde einmal injiziert, entweder 24 Stunden oder 2 Stunden vor der Injektion der mRNA oder 24 Stunden nach der Injektion der mRNA (entspricht den Gruppen GM-CSF T-1, GM-CSF T-0 und GM-CSF T+1). Die Menge an  $\beta$ -Galactosidase-spezifischen IgG1- oder IgG2a-Antikörpern, die im Blut der injizierten Mäuse enthalten waren, wurden durch ELISA bestimmt (1:10 Serumverdünnung). Der Hintergrund, der hauptsächlich durch das Serum von Puffer-injizierten Mäusen bei gleicher Verdünnung erhalten wurde, wurde abgezogen. Die linke Hälfte der Figur 3a zeigt  $\beta$ -Gal-spezifische IgG1-Antikörper (■), die rechte Hälfte der Figur 3a zeigt  $\beta$ -Gal-spezifische IgG2a-Antikörper (▨, grau).

#### Figur 3b:

Die *in vitro* Reaktivierung von T-Zellen durch  $\beta$ -Galactosidase wurde anhand einer Cytokin-Detektion am Tag 4 der Kultivierung überprüft. Der Anteil an

IFN $\gamma$  (■) und IL-4 (▨, grau) in dem Überstand der verwendeten Splenocyten-Kultur wurde mittels ELISA gemessen.

**Figur 3c:** Die cytotoxische Aktivität von Splenocyten, die in der Gegenwart von aufgereinigter  $\beta$ -Galactosidase für sechs Tage kultiviert wurden, wurde in einem Chrom-Freisetzungs-Assay überprüft. Die Zielzellen waren P815 (H2<sup>d</sup>)-Zellen, die entweder mit dem synthetischen Peptid TPHPARIGL, das dem dominanten H2-L<sup>d</sup>-Epitop von  $\beta$ -Galactosidase entspricht, beladen waren (■) oder nicht beladen waren (□).

**Figur 4** zeigt Tabelle 1, in der die Gesamtanzahl der injizierten Mäuse dargestellt wird. Die Gesamtanzahl der Mäuse, deren Splenocyten eine detektierbare Cytokin-Freisetzung oder eine  $\beta$ -Galactosidase-spezifische cytotoxische Aktivität *in vitro* in unabhängigen Experimenten zeigten, wird dargestellt. Mäuse, bei denen mindestens 10% mehr TPHPARIGL-beladene Zellen abgetötet wurden, im Vergleich zu den durchschnittlich abgetöteten Zellen der Negativkontrollgruppe (Puffer-injizierte Mäuse), wurden als Mäuse mit einer Immunantwort (respondierende) eingestuft. Splenocytenkulturen, die mindestens 100 pg/ml Cytokin mehr als den Gesamtgehalt an Cytokin in den Splenocytenkulturen, der Negativkontrollmäuse (Puffer-injizierte Mäuse) enthielten, wurden als respondierende Kulturen (respondierende Mäuse) eingestuft. Die fettgedruckten Zahlen zeigen Gruppen an, in denen mehr als die Hälfte der Mäuse eine Immunantwort auf die Vakzine gemäß der untersuchten Parameter (Cytokin oder cytotoxische Aktivität) zeigten.

Die nachfolgenden Beispiele sind dazu gedacht, die Erfindung weiter zu illustrieren. Sie sind nicht dazu gedacht die Gegenstände der Erfindung hierauf zu beschränken.

## 30 Beispiele

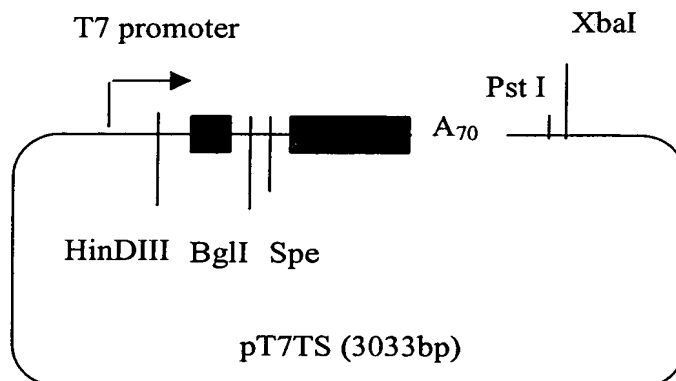
## Beispiel 1: Herstellung der mRNA

Die mRNA wurde durch *in vitro* Transkription geeigneter Template-DNA und anschliessender Extraktion und Aufreinigung der mRNA erhalten. Hierzu können Standardverfahren verwendet, die im Stand der Technik zahlreich beschrieben werden und dem Fachmann ge-  
 5 häufig sind. Beispielsweise Maniatis et al. (2001), Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Gleiches gilt auch für die Sequenzierung der mRNA, die sich der (nachfolgend beschriebenen) Aufreinigung der mRNA anschloss. Hier wurde insbesondere das NBLAST-Programm verwendet.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen mRNA erfolgte generell gemäß nachfolgender Vorgehensweise:

### 1. Vektor

Die Gene, für welche die jeweilige mRNA kodiert, wurden in den Plasmidvektor pT7TS eingeführt. pT7TS enthält nicht translatierte Regionen des alpha- oder des beta-Globingens so-  
 15 wie einen polyA-Schwanz von 70 Nukleotiden:



■ Xenopus  $\beta$ -globin 5'Untranslated region:  
 GCTTGTTCTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGC





5  Xenopus  $\beta$ -Globin 3' nicht translatierte Region ("Untranslated region"):  
 GACTGACTAGGATCTGGTTACCACTAAACCAGCCTCAAGAACACCC-  
 GAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATAACCAACTTACACTTACAA-  
 AATGTTGTCCCCCAAATGTAGCCATTTCGTATCTGCTCCTAATAAA-  
 AAGAAAGTT TCTTCACATTCTA  
 oder  
 human  $\alpha$ -Globin nicht translatierte Region: CTAGTGACTGA-  
 TAGCCCGCTGGGCTCCCAACGGGCCCCTCCTCCCCTCCTTGCACC

Abbildung 1: Graphik des Plasmidvektors pT7TS

10  Plasmide mit hoher Reinheit wurden mit dem Qiagen Endo-free Maxiprep Kit oder mit dem Machery-Nagel GigaPrep Kit erhalten. Die Sequenz des Vektors wurde über eine Doppelstrang-Sequenzierung vom T7 Promotor bis zur PstI- oder XbaI-Stelle kontrolliert und dokumentiert. Plasmide, deren einklonierte Gensequenz korrekt und ohne Mutationen war, wurden für die *in vitro* Transkription benutzt.

15

## 2. Gene

Die Gene, für welche die erfindungsgemäße mRNA kodiert, wurden mittels PCR amplifiziert oder aus den (oben beschriebenen) Plasmiden extrahiert. Beispiele für Genkonstrukte, die eingesetzt wurden, sind

20

GP100 (Accession number M77348):  
 PCR-Fragment SpeI in T7TS HindIII blunt/SpeI

MAGE-A1 (Accession number M77481):  
 25 Plasmid-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

MAGE-A6 (Accession number: NM\_005363):  
 PCR-Fragment SpeI in T7TS HindIII blunt/SpeI

30 Her2/neu (Accession number: M11730):

PCR-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

Tyrosinase (Accession number: NM\_000372):

Plasmid-Fragment EcoRI blunt in T7TS HindIII blunt/SpeI blunt

5

Melan-A (Accession number: NM\_005511):

Plasmid-Fragment NotI blunt in T7TS HindIII blunt/SpeI blunt

CEA (Accession number: NM\_004363):

10 PCR-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

Tert (Accession number: NM\_003219):

PCR fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

15 VT1 (Accession number: NM\_000378):

Plasmid fragment EcoRV/KpnI blunt in T7TS HindIII blunt/SpeI blunt

PR3 (Accession number: NM\_002777):

Plasmid fragment EcoR1 blunt/XbaI in T7TS HindIII blunt/SpeI

20

PRAME (Accession number: NM\_006115):

Plasmid fragment BamHI blunt/XbaI in T7TS HindIII blunt/SpeI

Survivin (Accession number AF077350):

25 PCR-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

Mucin1 (Accession number NM\_002456):

Plasmid-Fragment: SacI blunt/BamHI in T7TS HindIII blunt/BglII

30 Tenascin (Accession number X78565):

PCR fragment BglII blunt/SpeI in T7TS HindIII blunt/SpeI

EGFR1 (Accession number AF288738):

PCR fragment *Hin*DIII/*Spe*I in T7TS *Hin*DIII/*Spe*I

Sox9 (Accession number Z46629):

- 5 PCR fragment *Hin*DIII/*Spe*I in T7TS *Hin*DIII/*Spe*I

Sec61G (Accession number NM\_014302):

PCR fragment *Hin*DIII/*Spe*I in T7TS *Hin*DIII/*Spe*I

- 10 PTRZ1 (Accession number NM\_002851):

PCR fragment *Eco*RV/*Spe*I in T7TS *Hin*DIII blunt/*Spe*I

### 3. *in vitro* Transkription

#### 3.1. Herstellung Protein-freier DNA

- 15 500 µg von jedem der vorbeschriebenen Plasmide wurden in einem Volumen von 2,5 ml durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pst*I oder *Xba*I in einem 15 ml Falcon Röhrchen linearisiert. Dieses geschnittene DNA-Konstrukt wurde in die RNA Produktionseinheit überführt. 2,5 ml einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde zu der linearisierten DNA zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 2 Minuten gevortext und für 5
- 20 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert. Die wässrig Phase wurde abgehoben und mit 1,75 ml 2-Propanol in einem 15 ml Falcon Röhrchen vermischt. Dieses Gefäß wurde 30 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 5 ml von 75% Ethanol zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Ethanol wurde entfernt. Das Gefäß wurde nochmals für 2 Minuten zentrifugiert und die Reste des Ethanols
- 25 wurden mit einer Mikroliter-Pipettenspitze entfernt. Das DNA Pellet wurde dann in 500 µl RNase-freien Wasser aufgelöst (1 µg/µl).

#### 3.2. enzymatische mRNA-Synthese

##### Materialien:

- T7 Polymerase: aufgereinigt aus einem *E.coli*-Stamm, der ein Plasmid mit dem Gen für die Polymerase enthält. Diese RNA-Polymerase verwendet als Substrat nur T7 Phagen-Promotor-Sequenzen (Fa. Fermentas),
- NTPs: chemisch synthetisiert und über HPLC aufgereinigt. Reinheit über 96% (Fa. Fermentas),
- CAP Analogon: chemisch synthetisiert und über HPLC aufgereinigt. Reinheit über 90% (Fa. Trilink),
- RNase Inhibitor: Rnasin, Injectable grade, rekombinant hergestellt (*E.coli*) (Fa. Fermentas),
- DNase: Vertrieb als Medikament über Apotheken als Pulmozym® (dornase alfa) (Fa. Roche).

In ein 15 ml Falcon Röhrchen wurde folgendes Reaktionsgemisch pipettiert:

- 100 µg linearisierte proteinfreie DNA,
- 400 µl 5x Puffer (Tris-HCl pH 7.5, MgCl<sub>2</sub>, Spermidin, DTT, Inorganische Pyrophosphatase 25 U),
- 20 µl Ribonuclease Inhibitor (rekombinant, 40 U/µl);
- 80 µl rNTP-Mix (ATP, CTP, UTP 100mM) , 29µl GTP (100 mM);
- 116 µl Cap Analog (100 mM);
- 50 µl T7 RNA Polymerase (200 U/µl) ;
- 1045 µl RNase-freies Wasser.

Das Gesamtvolumen betrug 2 ml und wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Danach wurden 300 µl DNase: Pulmozyme™ (1 U/µl) zugegeben und die Mischung wurde für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurde das DNA-Template enzymatisch abgebaut.

## 5. Aufreinigung der mRNAs

### 5.1. LiCl-Präzipitation (Lithium-Chlorid/Ethanol-fällung)

- 30 Bezogen auf 20-40 µg RNA wurde diese folgendermaßen durchgeführt:

LiCl-Fällung 25 µl LiCl-Lösung [8M]

30  $\mu$ l WFI („water for injection“, Wasser zur Injektion) wurden zu dem Transkriptionsansatz (20  $\mu$ l) gegeben und vorsichtig gemischt. In das Reaktionsgefäß wurden 25  $\mu$ l LiCl-Lösung zugegeben und die Lösungen mindestens 10 Sekunden gevortext. Der Ansatz wurde bei -20°C für mindestens 1 Stunde inkubiert. Das verschlossene Gefäß wurde anschließend bei 4°C mit 4.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

#### Waschen

Es wurden 5  $\mu$ l 75%iger Ethanol zu jedem Pellet zugegeben (unter der Sicherheitswerkbank). Die verschlossenen Gefäße wurden 20 Minuten bei 4°C mit 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen (unter der Sicherheitswerkbank) und es wurde nochmals 2 Minuten bei 4°C mit 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt (unter der Sicherheitswerkbank). Danach wurde das Pellet ca. 1 Stunde getrocknet (unter der Sicherheitswerkbank).

#### Resuspension

Zu den gut getrockneten Pellets wurden je 10  $\mu$ l WFI gegeben (unter der Sicherheitswerkbank). Das jeweilige Pellet wurde sodann in einem Schüttelgerät über Nacht bei 4°C gelöst.

### 5.2. Endreinigung

Die Endreinigung erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Sie kann jedoch ebenfalls mittels Anionenaustauschchromatographie erfolgen (z.B. MEGAclean™ von Fa. Ambion oder Rneasy von Fa. Qiagen). Nach dieser Aufreinigung der mRNA, wurde die RNA gegen Isopropanol und NaCl präzipitiert (1 M NaCl 1:10, Isopropanol 1:1, gevortext, 30 Min. bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen). Die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigte RNA wurde in RNase freiem Wasser gelöst und mindestens 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Konzentration jeder mRNA wurde bei OD<sub>260</sub> Absorption gemessen. (Die Chlorophorm-Phenol-Extraktion erfolgte nach Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1,2,3 (1989)).

### **Beispiel 2: Stabilisierung der mRNA**

Eine beispielhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen, stabilisierten mRNA betrifft eine  $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierte mRNA. Eine derart stabilisierte mRNA wies die folgende

Struktur auf: Cap- $\beta$ -Globin-UTR (80 Basen) –  $\beta$ -Galactosidase-Kodierungssequenz –  $\beta$ -Globin-3'-UTR (ca. 180 Basen)-poly A-Schwanz ( $A_{30}C_{30}$ ). Anstelle der  $\beta$ -Galactosidase-Kodierungssequenz wurden ebenfalls Konstrukte erstellt, die eine für ein bereits oben beschriebenes Antigen aus einem Pathogen oder Tumor kodierende Sequenz aufwiesen.

5

Als weitere beispielhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen, stabilisierten mRNA wurde die Nukleinsäuresequenz des kodierenden Bereichs der mRNA bezüglich ihres G/C-Gehalts optimiert. Zur Ermittlung der Sequenz einer modifizierten, erfindungsgemäßen mRNA wurde das in der WO 02/098443 beschriebene Computerprogramm verwendet, das mit Hilfe des genetischen Codes bzw. dessen degenerativer Natur die Nucleotid-Sequenz einer beliebigen mRNA derart modifiziert, dass sich ein maximaler G/C-Gehalt in Verbindung mit der Verwendung von Codons, die für möglichst häufig in der Zelle vorkommende tRNAs kodieren, ergibt, wobei die durch die modifizierte mRNA kodierte Aminosäure-Sequenz gegenüber der nicht-modifizierten Sequenz vorzugsweise identisch ist. Alternativ kann auch nur der G/C-Gehalt oder nur die Codonverwendung gegenüber der ursprünglichen Sequenz modifiziert werden. Der Quellcode in Visual Basic 6.0 (eingesetzte Entwicklungsumgebung: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 mit Servicepack 3) ist ebenfalls in der WO 02/098443, deren Offenbarung Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, angegeben.

10

15

### 20 Beispiel 3: Zellkultivierung

P815-Zellen wurden mit 10%igem Hitze-inaktivierten fötalen Kälberserum (PAN systems, Deutschland), 2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin ergänzt und in einem RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Verviers, Belgien) kultiviert. Die CTL-Kultivierung wurde in RPMI 1640-Medium, ergänzt mit 10%igem FCS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50  $\mu$ g/ml Gentamycin, 1x MEM-nicht essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat, ausgeführt. Die CTLs wurden eine Woche lang mit 1  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Galactosidase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) restimuliert. Am Tag 4 wurden die Überstände vorsichtig gesammelt und durch frisches Medium ersetzt, das 10 U/ml rIL-2 (Endkonzentration) enthielt.

25

30

In parallelen Versuchsansätzen erfolgte die Restimulierung mit jeweils 1,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Survivin, 1  $\mu\text{g}$  MAGE-3 und 0,8  $\mu\text{g}$  Muc-1. Sämtliche anderen Bedingungen waren in diesen Versuchsansätzen identisch mit den vorbeschriebenen Bedingungen.

## 5 Beispiel 4: Immunisierung von Mäusen

6 bis 12 Wochen alte, weibliche BALB/c AnNCrIBR (H-2d)-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Eine Genehmigung für die genetische (DNA und mRNA) Vakzinierung der Mäuse wurde von dem Komitee für Tierethik in Tübingen erteilt (Nummer IM/200). Die BALB-Mäuse wurden mit 20 mg Pentobarbital intraperitoneal anästhesiert. Den Mäusen wurden dann intradermal in beide Ohrmuscheln 25  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierte mRNA, kodierend für  $\beta$ -Galactosidase, die mit Injektionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES) verdünnt wurde, injiziert. Es wurden nachfolgend  $5 \cdot 10^3$  Units (1  $\mu\text{g}$ ) GM-CSF (Peprotech, Inc, Rocky Hill, New York, USA), verdünnt mit 25  $\mu\text{l}$  PBS, injiziert. Dies entsprach einer Gesamtmenge von 2  $\mu\text{g}$  (ca.  $10^4$  Units), die lediglich einmal injiziert wurde. Eine solche Dosierung liegt in dem untersten Bereich der normalerweise bei Mäusen gewählten Dosierungen (26). Zwei Wochen nach der ersten Injektion wurden die Mäuse unter den gleichen Bedingungen (wie bei der ersten Injektion) behandelt.

In parallelen Versuchsansätzen I, II + III, die unter den gleichen, vorstehend beschriebenen, Bedingungen, durchgeführt wurden, wurde Mäusen anstelle von 25  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierter mRNA, die für  $\beta$ -Galactosidase kodierte, und 1  $\mu\text{g}$  GM-CSF in

Versuchsansatz I: 30  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierter mRNA, kodierend für Survivin und 1,2  $\mu\text{g}$  IL-2, in

Versuchsansatz II: 23  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierter mRNA, kodierend für MAGE-3 und 2  $\mu\text{g}$  IL-12 und in

Versuchsansatz III: 18  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierter mRNA, kodierend für Muc-1 und 1  $\mu\text{g}$  IFN- $\alpha$

injiziert.

## Beispiel 5: Chromfreisetzungs-Assay

Splenocyten wurden *in vitro* mit aufgereinigter  $\beta$ -Galactosidase (1 mg/ml) stimuliert und die CTL-Aktivität wurde nach 6 Tagen unter Verwenden eines Standard  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays bestimmt (wie beispielsweise beschrieben von Rammensee et al., 1989, Immunogenetics 30: 296–302). Die Sterberate der Zellen wurde anhand der in das Medium freigesetzten Menge an  $^{51}\text{Cr}$  (A) im Vergleich zu der Menge spontaner  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung der Zielzellen (B) und dem Gesamtgehalt an  $^{51}\text{Cr}$  von 1% Triton-X-100-lysierten Zielzellen (C) mittels der Formel:

$$\% \text{ Zelllyse} = (A - B) \div (C - B) \times 100$$

bestimmt.

10 In parallelen Versuchsansätzen erfolgte die Stimulierung der Splenocyten mit Survivin, MAGE-3 und Muc-1 (Konzentration jeweils 1 mg/ml). Sämtliche anderen Bedingungen in diesen Versuchsansätzen waren identisch mit den vorbeschriebenen Bedingungen.

#### Beispiel 6: ELISA

15

MaxiSorb-Platten von Nalgene Nunc International (Nalge, Dänemark) wurden über Nacht bei 4 °C mit 100  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Galactosidase bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Antikörper-ELISA) oder mit 50  $\mu\text{l}$  anti-Maus-anti- $\text{IFN}\gamma$ - oder -IL-4- (Cytokin-ELISA) „Capture“-Antikörpern (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Beschichtungspuffer (0,02%  $\text{NaN}_3$ , 15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 15 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6) beschichtet. Die Platten wurden dann für 2 Stunden bei 37 °C mit 200  $\mu\text{l}$  of Blockierungspuffer (PBS-0,05% Tween 20-1% BSA) abgesättigt. Nachfolgend wurden sie mit Sera (Antikörper-ELISA) bei 1:10-, 1:30- und 1:90-Verdünnungen in Waschpuffer oder 100  $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstandes (Cytokin-ELISA) für 4 bis 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  von 1:1.000-Verdünnungen von Ziege-anti-Maus-IgG1- oder -IgG2a-Antikörpern (Antikörper-ELISA) von Caltag (Burlington, CA, USA) oder 100  $\mu\text{l}/\text{Well}$  biotinylierte anti-Maus-anti- $\text{IFN}\gamma$ - oder -IL-4- (Cytokin-ELISA) Detektions-Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Blockierungspuffer hinzugefügt und die Platten 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

30

Für den Cytokin-ELISA wurden nach 3 Waschschritten mit Waschpuffer, 100  $\mu\text{l}$  einer 1:1.000-Verdünnung Streptavidin-HRP (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) pro Well



hinzugefügt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden pro Well 100  $\mu$ l ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))-Konzentrat bei einer Konzentration von 300 mg/l in 0,1 M Zitronensäure, pH 4,35) hinzugefügt. Nach weiteren 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurde die Extinktion bei OD<sub>405</sub> mit einem Sunrise ELISA-Reader von Tecan (Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Mengen der Cytokine wurden anhand einer Standardkurve berechnet, die durch Titrieren bestimmter Mengen rekombinanter Cytokine erstellt wurde (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).

In parallelen Versuchsansätzen wurden die MaxiSorb-Platten mit Survivin, MAGE-3 und Muc-1 (jeweils 100  $\mu$ l) beschichtet. Sämtliche anderen Bedingungen in diesen parallelen Versuchsansätzen waren mit den vorbeschriebenen Bedingungen identisch.

## Literaturliste

1. Tang,D.C., DeVit,M. & Johnston,S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154 (1992).
2. Ulmer,J.B. *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749 (1993).
3. Wang,B. *et al.* Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4156-4160 (1993).
4. Robinson,H.L., Hunt,L.A. & Webster,R.G. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11, 957-960 (1993).
5. Fynan,E.F. *et al.* DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11478-11482 (1993).
6. Ulmer,J.B. An update on the state of the art of DNA vaccines. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4, 192-197 (2001).
7. Donnelly,J., Berry,K. & Ulmer,J.B. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int J Parasitol.* 33, 457-467 (2003).
8. Klinman,D.M. *et al.* DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin. Immunopathol.* 19, 245-256 (1997).
9. Gilkeson,G.S., Pippen,A.M. & Pisetsky,D.S. Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest* 95, 1398-1402 (1995).
10. Saenz-Badillos,J., Amin,S.P. & Granstein,R.D. RNA as a tumor vaccine: a review of the literature. *Exp Dermatol* 10, 143-154 (2001).

11. Sullenger,B.A. & Gilboa,E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 418, 252-258 (2002).
12. Nair,S.K. *et al.* Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 16, 364-369 (1998).
13. Ying,H. *et al.* Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat. Med.* 5, 823-827 (1999).
14. Schirmacher,V. *et al.* Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine. *Gene Ther.* 7, 1137-1147 (2000).
15. Martinon,F. *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 23, 1719-1722 (1993).
16. Vassilev,V.B., Gil,L.H. & Donis,R.O. Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhea virus. *Vaccine* 19, 2012-2019 (2001).
17. Hoerr,I., Obst,R., Rammensee,H.G. & Jung,G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J Immunol.* 30, 1-7 (2000).
18. Granstein,R.D., Ding,W. & Ozawa,H. Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA. *J Invest Dermatol* 114, 632-636 (2000).
19. Iwasaki,A., Stiernholm,B.J., Chan,A.K., Berinstein,N.L. & Barber,B.H. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *J Immunol* 158, 4591-4601 (1997).
20. Warren,T.L. & Weiner,G.J. Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 168-173. (2000).

21. Scheel,B. *et al.* Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur. J. Immunol.* 34, 537-547 (2004).
22. Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S. & Reis E Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531 (2004).
23. Heil,F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529 (2004).
24. Kwissa,M., Kroger,A., Hauser,H., Reimann,J. & Schirmbeck,R. Cytokine-facilitated priming of CD8(+) T cell responses by DNA vaccination. *J Mol. Med.* 81, 91-101 (2003).
25. Cho,J.H., Lee,S.W. & Sung,Y.C. Enhanced cellular immunity to hepatitis C virus non-structural proteins by codelivery of granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene in intramuscular DNA immunization. *Vaccine* 17, 1136-1144 (1999).
26. Weber,J. *et al.* Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multi-peptide vaccine for resected Stage II melanoma. *Cancer* 97, 186-200 (2003).
27. Kusakabe,K. *et al.* The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J Immunol* 164, 3102-3111 (2000).

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Immunstimulation in einem Säugetier umfassend die folgenden Schritte:
  - a. Verabreichen mindestens einer mRNA enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und
  - b. Verabreichen mindestens eines Cytokins, mindestens einer CpG-DNA oder mindestens einer Adjuvanz-mRNA.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Schritt b. 1 Minute bis 48 Stunden, bevorzugt 20 Minuten bis 36 Stunden, ebenfalls bevorzugt 30 Minuten bis 24 Stunden, stärker bevorzugt 10 Stunden bis 30 Stunden, am stärksten bevorzugt 12 Stunden bis 28 Stunden, insbesondere bevorzugt 20 Stunden bis 26 Stunden, nach Schritt a. erfolgt.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei in Schritt a. zusätzlich mindestens ein RNase-Inhibitor, vorzugsweise RNAsin oder Aurintricarbonsäure, verabreicht wird.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Immunantwort verstärkt bzw. moduliert wird, vorzugsweise von einer Th2-Immunantwort in eine Th1-Immunantwort verändert wird.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) einen Bereich enthält, der für mindestens ein Antigen aus einem Tumor ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 707-AP, AFP, ART-4, BAGGE,  $\beta$ -Catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CMV pp65, CT, Cyp-B, DAM, EGFR1, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HBS, HER-2/neu, HLA-A\*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (oder hTRT), Influenza Matrix-Protein, insbesondere Influenza A-Matrix-M1-Protein oder Influenza B-Matrix-M1-Protein, iCE, KIAA0205, LAGE, z.B. LAGE-1, LDLR/FUT, MAGE, z.B. MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, MAGE-

A1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-10, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR $\alpha$ , PRAME, Proteinase 3, PSA, PSM, PTPRZ1, RAGE, RU1 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, SEC61G, SOX9, SPC1, SSX, Survivin, TEL/AML1, TERT, TNC, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, Tyrosinase und WT1 kodiert.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Cytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus IL-1 ( $\alpha/\beta$ ), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ , MCAF, RANTES, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  und besonders bevorzugt G-CSF oder GM-CSF.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) als nackte mRNA vorliegt.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) als Globin-UTR (untranslated regions)-stabilisierte mRNA, insbesondere als  $\beta$ -Globin-UTR-stabilisierte mRNA, vorliegt.

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) als modifizierte mRNA, insbesondere als stabilisierte mRNA, vorliegt.

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) gegenüber dem G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der Wildtyp-RNA erhöht ist, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten mRNA gegenüber der kodierte Aminosäuresequenz der Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der modifizierten mRNA aus Schritt (a.)

und/oder aus Schritt (b.) gegenüber dem A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der Wildtyp-mRNA erhöht ist.

12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der kodierende Bereich und/oder der 5'- und/oder 3'-nicht-translatierte Bereich der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) gegenüber der Wildtyp-mRNA derart verändert ist, dass er keine destabilisierenden Sequenzelemente enthält, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten mRNA gegenüber der Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) eine 5'-Cap-Struktur und/oder einen Poly(A)-Schwanz, vorzugsweise von mindestens 25 Nukleotiden, stärker bevorzugt von mindestens 50 Nukleotiden, noch stärker bevorzugt von mindestens 70 Nukleotiden, ebenfalls stärker bevorzugt von mindestens 100 Nukleotiden, am stärksten bevorzugt von mindestens 200 Nukleotiden, und/oder mindestens eine IRES und/oder mindestens eine 5'- und/oder 3'-Stabilisierungssequenz aufweist.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) mindestens ein Analoges natürlich vorkommender Nukleotide aufweist.

15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) mit mindestens einem kationischen oder polykationischen Agens komplexiert oder kondensiert ist.

16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das kationische oder polykationische Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Protamin, Poly-L-Lysin, Poly-L-Arginin und Histonen.

17. Erzeugnis, enthaltend mindestens eine mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und

mindestens ein Cytokin, mindestens eine CpG DNA oder mindestens eine Adjuvanz-mRNA als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung bei der Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen, Tumorerkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, viralen und/oder bakteriellen Infektionen.

5

18. Kit, enthaltend mindestens eine mRNA enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und mindestens ein Cytokin, oder mindestens eine CpG DNA mindestens eine Adjuvanz-mRNA wobei die mindestens eine mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und das mindestens eine Cyokin oder die mindestens eine CpG DNA oder die mindestens eine Adjuvanz-mRNA voneinander getrennt sind.

10

15

19. Verwendung des Kits nach Anspruch 17 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen, Tumoerkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, viralen und/oder bakteriellen Infektionen.

20



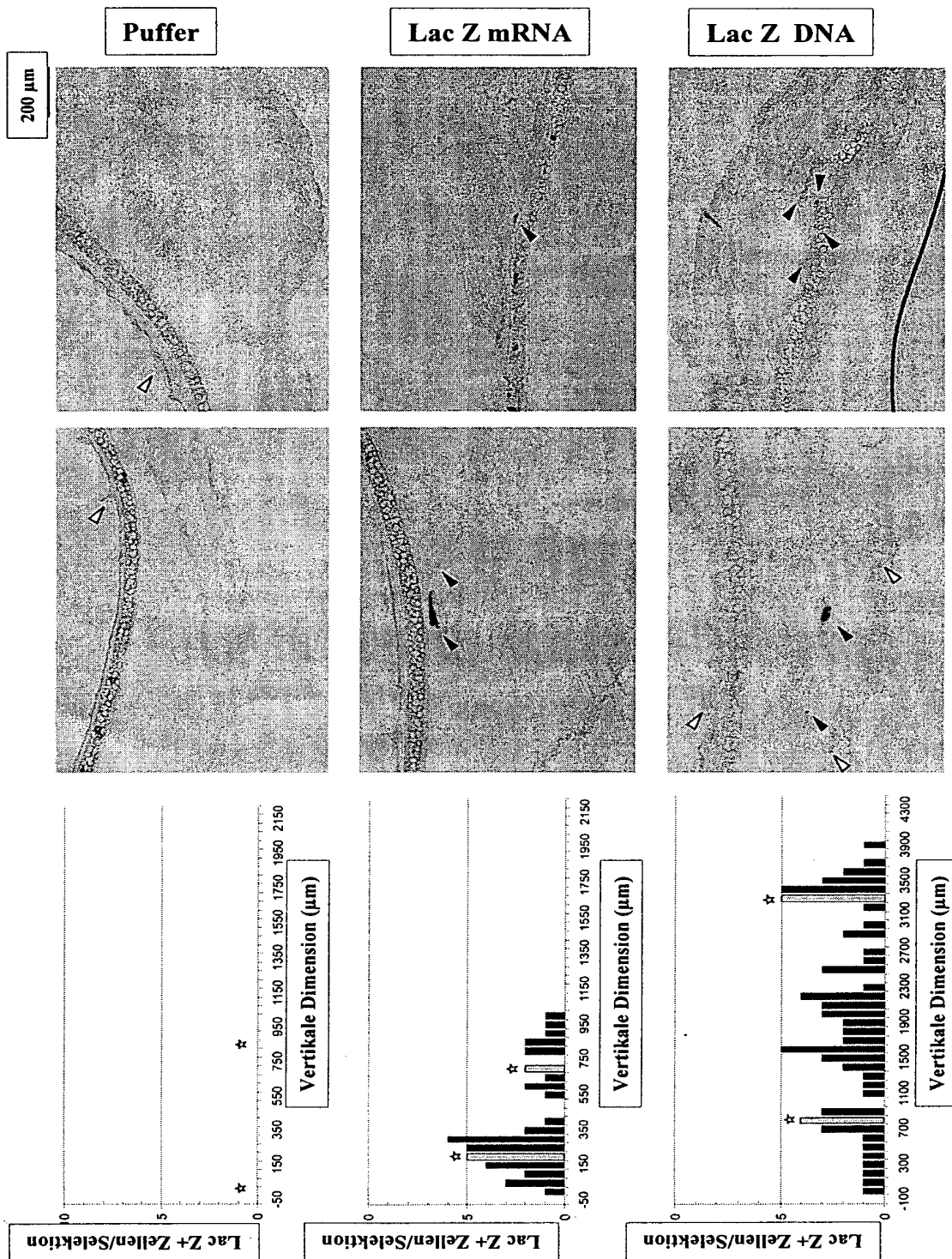
## Zusammenfassung

5

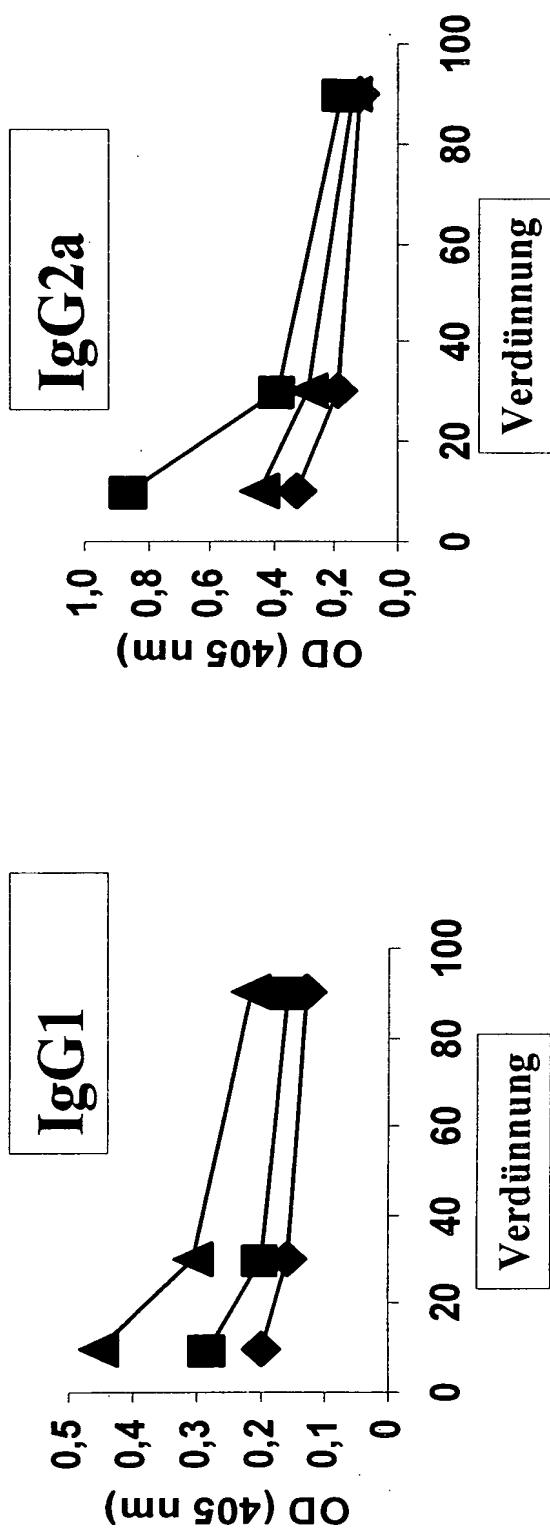
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immunstimulation in einem Säugtier, welches a. das Verabreichen mindestens einer mRNA enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und b. das Verabreichen mindestens eines Cytokins, mindestens einer CpG DNA oder mindestens einer Adjuvanz-mRNA umfasst. Ebenfalls betrifft die Erfindung ein Erzeugnis sowie ein Kit, enthaltend die/das mRNA und Cytokin bzw. CpG DNA bzw. Adjuvanz-mRNA der Erfindung enthält.

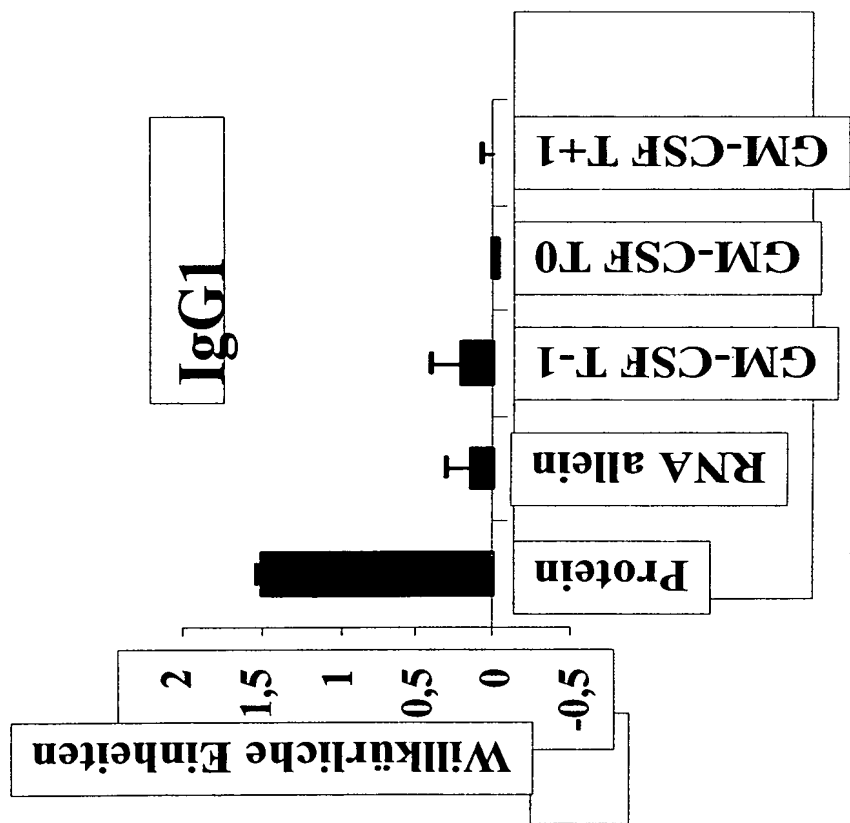
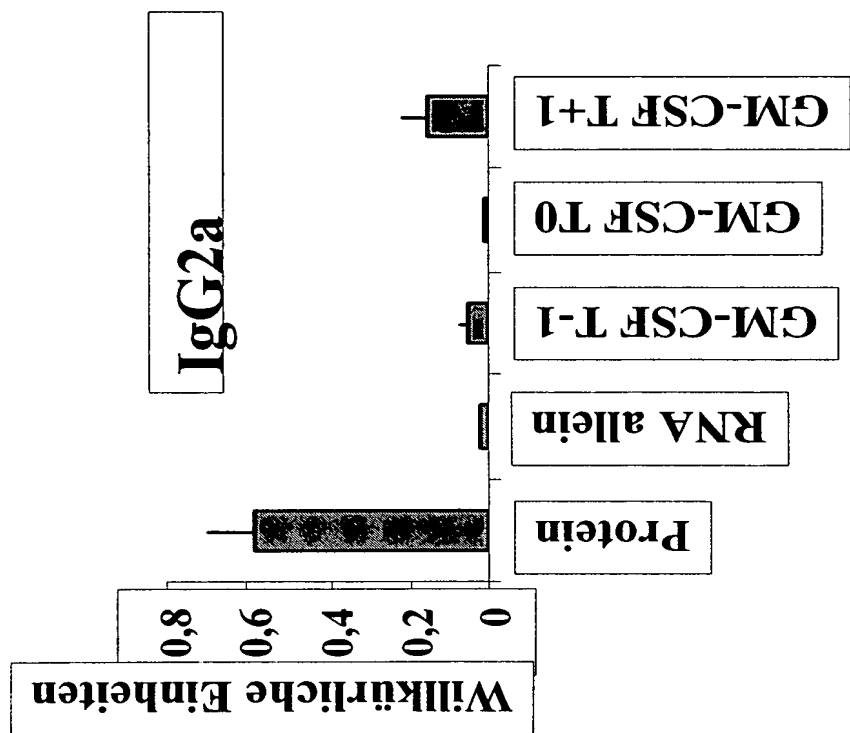
10

Figur 1



Figur 2

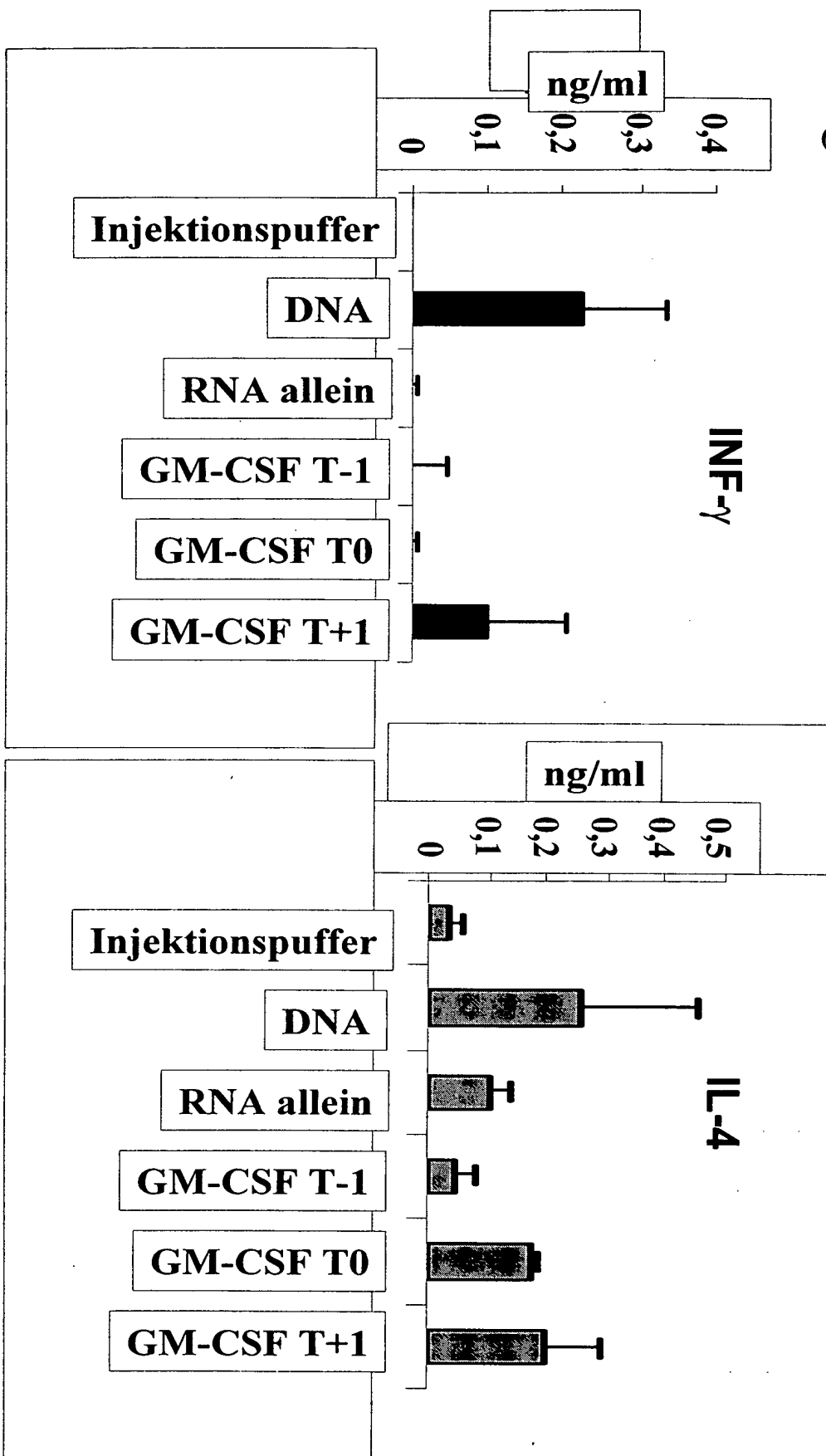




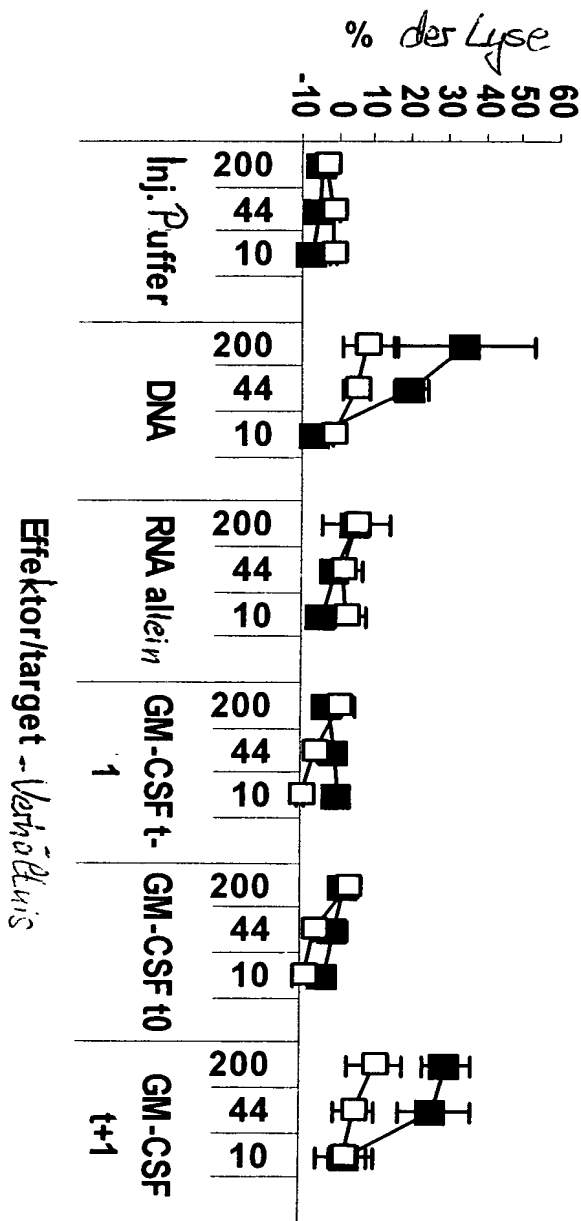
Figur 3a

4/6

Figur 3b



Figur 3c



Figur 4

	Cytotoxische Aktivität	Detektion von IL4	Detektion von Interferon- $\gamma$
DNA-Injektion	3/8	2/8	5/8
mRNA- Injektion	1/12	7/12	0/12
mRNA+GM- CSF t-1	1/9	6/9	3/9
mRNA+GM- CSF t0	3/8	5/8	4/8
mRNA+GM- CSF t+1	8/12	6/12	9/12

Tabelle 1: Gesamtanzahl injizierter Mäuse